

Wykaz skrótów do rozdziału 5

ADT – ditiolotion anetolu

AMPA – kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izooksazolopropionowy

AP-5 – kwas 2-amino-5-fosfonowalerianowy

AP-7 – kwas 2-amino-7-fosfonoheptanowy

BSO – butioninosulfoksyimina

BT – benzotiazyna

c-AMP – cykliczny adenozyomono fosforan

CGP 37849 – kwas DL-(E)-2-amino-4-metylo-5-fosfono-3-walerianowy

CGP 39551 – ester etylowy kwasu (E)-2-amino-4-metylo-5-fosfono-3-walerianowego

CGS 19755 – kwas cis-4-fosfonometylo-2-piperydynowy

CPP – kwas 3-(2-karboksypiperazyno-4-ilo)propylo-1-fosfonowy

Cys – cysteina

Cys-Gly – cysteinyloglicyna

DA – dopamina

DTNB – 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoesowy

DTT – ditiotreitol

Glu – glutaminian

Gly – glicyna

GPx – peroksydaza glutationowa

GR – reduktaza glutationowa

GSH – glutation (forma zredukowana)

GSNO – nitrozoglutation

GSSG – disiarczek glutationu

γ -Glu-Cys – glutamylcysteina

γ -GT – γ -glutamylotranspeptydaza

H₂O₂ – nadtlenek wodoru

L-DOPA – 3,4-dihydroksyfenylo-L-alanina

MAO – monoaminooksydaza

MK-801 – maleinian 5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyklohepteno-5,10-iminy

MPP⁺ – jon 1-metylo-4-fenylpirydynowy

MPTP – 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna

NAC – N-acetylocysteina

NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

NMDA – kwas N-metylo-D-asparaginowy

NO[•] – rodnik tlenu azotu

O₂^{•-} – anionorodnik ponadtlenkowy

OH[•] – rodnik hydroksylowy

6-OHDA – 6-hydroksydopamina

ONOO⁻ – nadtlenoazotyn

OTC – kwas 2-oksofiazolidyno-4-karboksylowy

RFT – reaktywne formy tlenu

5-S-Cys-DA – 5-S-cysteinyldopamina

5. GLUTATION

Metabolizm i biologiczna rola w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN)

Elżbieta Lorenc-Koci

5.1. Wprowadzenie

Stres oksydacyjny jest zjawiskiem polegającym na pojawieniu się w obrębie komórki szeregu cytopatologicznych zmian, będących następstwem kaskady reakcji wolnorodnikowych. Do peroksydatywnych uszkodzeń dochodzi wtedy, gdy procesy generujące reaktywne formy tlenu (RFT) w komórce przeważają nad możliwościami ich usuwania przez system antyoksydacyjnej obrony. Źródłami wolnych rodników w komórkach są procesy metaboliczne, a szczególną rolę odgrywa mitochondrialny metabolizm oksydacyjny, peroksydacja lipidów, szlaki proteolityczne oraz tlenek azotu [1, 2]. W warunkach fizjologicznych w komórkach panuje stan równowagi pomiędzy powstawaniem wolnych rodników a ich „wymiataniem” przez system obrony antyoksydacyjnej. Przesunięcie stanu równowagi na korzyść procesów oksydacyjnych prowadzi do stresu oksydacyjnego i ma miejsce w pewnych stanach patologicznych. Wśród przyczyn prowadzących do zachwiania równowagi oksydacyjno-redukcyjnej należy wymienić: utratę czynników redukujących [3, 4], obniżenie aktywności enzymów o antyoksydacyjnym działaniu [5, 6] oraz nasilenie produkcji wolnych rodników pod wpływem czynników endo- lub egzogennych [7]. Wolne rodniki mogą uszkadzać DNA [1, 8] oraz enzymy i białka strukturalne [9], wywoływać peroksydację lipidów [1, 10] oraz indukować reakcje autooksydacyjne, takie jak np. polimeryzacja katecholamin [11]. Oksydacyjnie zmodyfikowane cząsteczki zaburzają prawidłowe funkcje komórek, co w konsekwencji może prowadzić do ich śmierci na drodze apoptozy lub nekrozy.

Mózg różni się od innych organów ciała pod względem intensywności reakcji generujących oraz usuwających wolne rodniki. W przypadku człowieka mózg, pomimo że stanowi zaledwie 2% wagi ciała, zużywa aż 20% tlenu pobieranego przez cały organizm [12]. Tak wysoki procent zużycia tlenu wskazuje, że mózg jest narządem, w którym produkcja RFT w procesie fosforylacji oksydacyjnej jest niezwykle wysoka. Neurony są komórkami szczególnie wrażliwymi na stres oksydacyjny ze względu na niską aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenukowa, katalaza i peroksydaza glutationowa, oraz wysoką tlenową aktywność metaboliczną. Neurony są ponadto komórkami niepodlegającymi replikacji, dlatego ich ubytek w mózgu osobników dorosłych nie może być kompensowany [13]. Tkanka mózgowa będąc bogata w lipidy zawierające nienasycone kwasy tłuszczowe, łatwo może ulegać uszkodzeniom peroksydacyjnym [1, 14]. Obecność w pewnych komórkach mózgu znacznych ilości jonów metali przejściowych, takich jak żelaza (Fe), miedzi (Cu) i manganu (Mn) może dodatkowo sprzyjać powstawaniu reaktywnych form tlenu. Ko-

mórkowymi markerami stresu oksydacyjnego są: a) obniżony poziom czynników redukcyjnych – glutationu, askorbinianu i α -tokoferolu, b) wzrost poziomu disiarczku glutationu (GSSG), c) wzrost poziomu peroksydacyjnie uszkodzonych cząsteczek lipidów, białek oraz DNA [15].

Dane kliniczne, uzyskane z badań nad ludzkim mózgiem, jak i eksperymentalne z modeli zwierzęcych imitujących niektóre schorzenia neurodegeneracyjne, sugerują, że stres oksydacyjny może być czynnikiem odpowiedzialnym za śmierć pewnych neuronów w chorobie Parkinsona, Alzheimerera oraz w stwardnieniu zanikowym bocznym [2, 16, 17]. Wszystkie te badania wskazują równocześnie, że sprawnie działający system obrony antyoksydacyjnej ma niezwykle ważne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania mózgu w ciągu długich lat życia człowieka. Jednym z ważniejszych antyoksydantów broniącym komórki mózgu przed atakiem wolnych rodników jest glutation (GSH). Niedobór tego peptydu wywołany u noworodków szczura podaniem nieodwracalnego inhibitora syntetazy γ -glutamylcysteinowej, butioninosulfoksyminy (BSO) prowadzi do uszkodzenia mitochondriów w komórkach kory mózgowej [18]. Ponadto inhibitor ten nasila toksyczne efekty związane z podwyższoną produkcją wolnych rodników np. podczas niedokrwienia [19] lub po podaniu modelowych neurotoksyn, takich jak 1-metylo-4-fenylpirydyny (MPP⁺) [20] lub 6-hydroksydopaminy (6-OHDA) [21]. Działanie powyższych neurotoksyn w warunkach niedoboru GSH może być rozważane w aspekcie patogenezy choroby Parkinsona, w przebiegu której dochodzi do obniżenia stężenia tego peptydu w części zbitiej substancji czarnej [3, 4]. Bardziej szczegółowo o tej chorobie będzie mowa później.

W rozdziale tym zostaną kolejno omówione funkcje, lokalizacja, transport i metabolizm GSH w mózgu w warunkach fizjologicznych oraz w schorzeniach neurologicznych, w których dochodzi do zmian w stężeniu lub metabolizmie GSH w różnych obszarach układu nerwowego.

5.2. Glutation w układzie nerwowym

5.2.1. Podstawowe funkcje glutationu

Glutation jest najbardziej rozpowszechnionym niskocząsteczkowym związkiem tiolowym w centralnym układzie nerwowym. Aktualnie dostępne dane literaturowe wskazują, że spośród wielu fizjologicznych funkcji tego peptydu najważniejsze i najlepiej poznane są jego zdolności redukcyjne. Zredukowany glutation (GSH) usuwa wolne rodniki i tym samym chroni błony komórkowe, DNA i białka przed stresem oksydacyjnym, a także przed ksenobiotykami. W komórce GSH jest niezbędny do utrzymywania grup hydrosulfidowych białek w formie zredukowanej, czyli do zachowania tiolowego potencjału redoksowego [22]. Obecność GSH jest konieczna w procesie podziału komórki [23], w regulacji wewnątrzkomórkowego metabolizmu oraz w procesie apoptozy [24, 25]. Badania ostatnich lat wskazują ponadto, że GSH oprócz dobrze znanego działania antyoksydacyjnego [26] może również pełnić w mózgu rolę specyficznego modulatora neurotransmisji glutaminianergicznej oraz nowego neuroprzekaznika [27, 28].

5.2.2. Rozmieszczenie glutationu w tkance nerwowej

GSH występuje zarówno w centralnym, jak i obwodowym systemie nerwowym. Jego stężenie w mózgu człowieka, małpy i szczura jest stosunkowo wysokie i waha się od 2 do 3 mM [29, 30], natomiast w płynie mózgowo-rdzeniowym jest bardzo niskie i wynosi u człowieka około 5 μ M [26, 31], a u szczura 0,2 μ M [32]. Zredukowany GSH jest postacią dominującą w układzie nerwowym (99,8%), zaś forma utleniona disulfidowa (GSSG) stanowi znikomą jego frakcję (0,2%) [29]. Rozmieszczenie GSH w tkance mózgowej jest bardzo nierównomierne.

Mózg jest wysoce heterogennym organem z dużą ilością różnego typu komórek, zarówno neuronalnych, jak i nieneuronalnych. Komórki mózgu charakteryzują się znacznym morfologicznym zróżnicowaniem, a w pojedynczej komórce istnieje ścisła biochemiczna kompartmentacja. Badania histochemiczne z użyciem specyficznych barwników fluorescencyjnych, takich jak oranż rtęciowy lub aldehyd ftalowy, ujawniły, że GSH znajduje się głównie w komórkach glejowych oraz w aksonach i w zakończeniach komórek nerwowych [33, 34]. Ciała komórek nerwowych pozostawały zwykle niewybarwione, a więc były pozbawione GSH, lub charakteryzowały się słabą barwliwością świadczącą o niskiej zawartości tego peptydu. Bardziej selektywne badania immunohistochemiczne z zastosowaniem specyficznego przeciwciała dla GSH potwierdziły powyżej opisane rozmieszczenie tego peptydu w komórkach układu nerwowego [35]. Na poziomie komórkowym GSH zlokalizowano metodą immunohistochemiczną w cytoplazmie, mitochondriach oraz w jądrze komórkowym w różnych typach komórek mózgu [35].

Ilościowe oznaczenia GSH w tkance nerwowej były prowadzone przy użyciu metody spektrofotometrycznej opartej na reakcji Ellmana lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną (HPLC) [36, 37]. Stężenie GSH w neuronach, astrocytach i innych typach komórek glejowych obliczono na podstawie oznaczeń wykonanych na kulturach komórkowych. Badania te jednoznacznie wskazują, że ilość tego peptydu w astrocytach hodowli pierwotnych jest znacznie wyższa niż w neuronach [26, 38, 39]. W astrocytach ilość ta wynosi 30 do 80 nmol/mg białka, co odpowiada stężeniu od 8 do 20 mM, natomiast w neuronach – 1 do 40 nmol/g białka, co odpowiada stężeniu od 0,25 do 10 mM [38, 40]. Istnieje wiele przyczyn tak dalece zróżnicowanego stężenia GSH w neuronach i astrocytach. Jedną z nich wydaje się pochodzenie komórek pobieranych do hodowli. Badania Langevela i współpracowników [41] wykazują, że neurony kory mózgowej zawierają mniej GSH niż astrocyty pochodzące z tego obszaru mózgu, natomiast zarówno neurony, jak i astrocyty prądkowia i śródmózgowia posiadają podobne ilości tego peptydu. Z kolei badania z zastosowaniem techniki podwójnego barwienia GSH i białka hydroksylazy tyrozyny w kulturach komórek śródmózgowia wykazują, że neurony dopaminergiczne charakteryzują się znacznie niższą zawartością tego peptydu niż pozostałe komórki tych hodowli [41]. Niskie stężenie GSH w neuronach dopaminergicznych jest często łączone ze zwiększoną podatnością tych komórek na działanie stresu oksydacyjnego. Metabolizm GSH w hodowanych astrocytach i innych typach komórek glejowych oraz w neuronach będzie omówiony w podrozdziale 5.2.5.

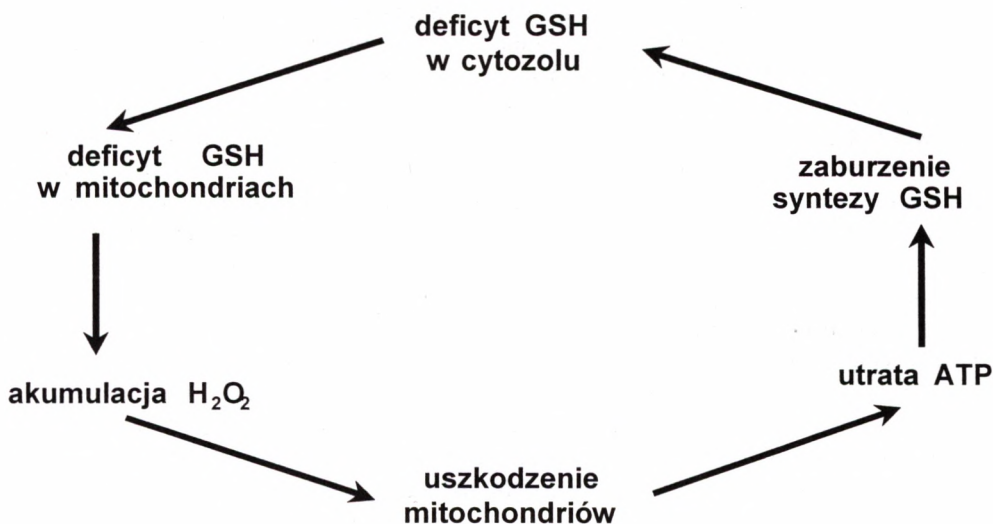
5.2.2.1. Rozmieszczenie glutationu w komórce

GSH znajdujący się w komórce przynależy do dwóch frakcji: cytozolowej (90%) i mitochondrialnej (10%) [42]. W cytozolu komórki znajdują się również enzymy odpowiedzialne za syntezę tego peptydu, których brak jest w mitochondriach. W mitochondriach występuje natomiast peroksydaza i reduktaza glutationowa oraz NADPH, czyli kompletny system enzymatyczny służący do usuwania nadtlenu wodoru (H_2O_2). Peroksydaza glutationowa (GPx) jest głównie zlokalizowana w *matrix* i wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Bardzo niewielka jej ilość znajduje się również w miejscach kontaktu między wewnętrzną a zewnętrzną błoną mitochondrialną [43]. Taka lokalizacja enzymu wskazuje na jego strategiczną rolę w procesie eliminowania nadtlenu wodoru powstającego w wewnętrznej i zewnętrznej błonie oraz wodoronadtlenków lipidów powstających w błonie wewnętrznej podczas peroksydacyjnych uszkodzeń.

GSH znajdujący się w mitochondriach pochodzi z frakcji cytozolowej komórki [44], a jego translokacja do mitochondriów odbywa się przy udziale specyficznego transportera zależnego od ATP [45]. Dlatego spadek stężenia GSH w cytozolu wywiera bezpośredni wpływ na jego poziom w mitochondriach, co zostało eksperymentalnie udowodnione przez Jaina i współpracowników [18]. Według pewnych autorów, deficyt GSH w mitochondriach ujawnia się dopiero wtedy, gdy spadek w cytozolu dochodzi do stężenia poniżej 50% wartości kontrolnej [18, 46]. Transport GSH z cytozolu do mitochondriów jest bardzo efektywny i następuje już przy niskim stężeniu peptydu. Z kolei bardzo wolny wypływ GSH z mitochondriów do cytozolu świadczy o istnieniu mechanizmu zabezpieczającego te organelle przed jego utratą (np. w niekorzystnych warunkach przejściowego deficytu GSH wywołanego działaniem czynników toksycznych). W badaniach histologicznych z zastosowaniem mikroskopu elektronowego wykazano, że spadkowi GSH w komórkach mózgu towarzyszy pęcznienie mitochondriów, nasilona wakuolizacja oraz pękanie grzebieni i błon mitochondrialnych [18].

GSH znajdujący się w mitochondriach służy do utrzymywania w zredukowanej postaci grup hydrosulfidowych białek błon mitochondrialnych, co ma bardzo istotne znaczenie dla funkcji mitochondriów. Niedobór GSH w mitochondriach prowadzi do utlenienia tych białek, zwiększenia przepuszczalności błon mitochondrialnych dla jonów wapnia [47] oraz zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej [48]. Stopniowo proces ten może prowadzić do całkowitego zahamowania funkcji mitochondriów i śmierci komórek. Ryc. 1 ilustruje powiązania pomiędzy stężeniem GSH, produkcją wolnych rodników i uszkodzeniem mitochondriów.

Skutkiem niedoboru GSH w mitochondriach jest nadmierne gromadzenie się w nich nadtlenu wodoru (H_2O_2), który można uznać za produkt uboczny powstający w łańcuchu oddechowym. Dzieje się tak, ponieważ nie wszystkie cząsteczki tlenu ulegają w mitochondriach redukcji do wody i pewna ich część jest przekształcana do H_2O_2 i anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$). Z anionorodnika ponadtlenkowego w reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD), znajdującą się w mitochondriach mogą powstać następne cząsteczki nadtlenu wodoru.



Ryc. 1. Cykliczne sprzężenie między deficytem GSH, produkcją reaktywnych form tlenu a uszkodzeniem mitochondriów



W mózgu nadtlenek wodoru może powstawać również pod wpływem monoamino-oksydazy (MAO) znajdującej się w mitochondriach w czasie deaminacji oksydacyjnej monoamin (np. dopaminy). W warunkach niedoboru GSH nadtlenek wodoru nie może być skutecznie usuwany i wtedy w nieenzymatycznej reakcji Fentona, z udziałem jonów metali przejściowych dochodzi do generowania niebezpiecznego rodnika hydroksylowego, którego reaktywność prowadzi do rozległych uszkodzeń mitochondriów. Do uszkodzeń mitochondriów przy niedoborze GSH może również dochodzić pod wpływem nadtlenoazotynu (ONOO^-) powstającego w niezwykle szybkiej reakcji tlenu azotu z anionorodnikiem ponadtlenkowym [49, 50].



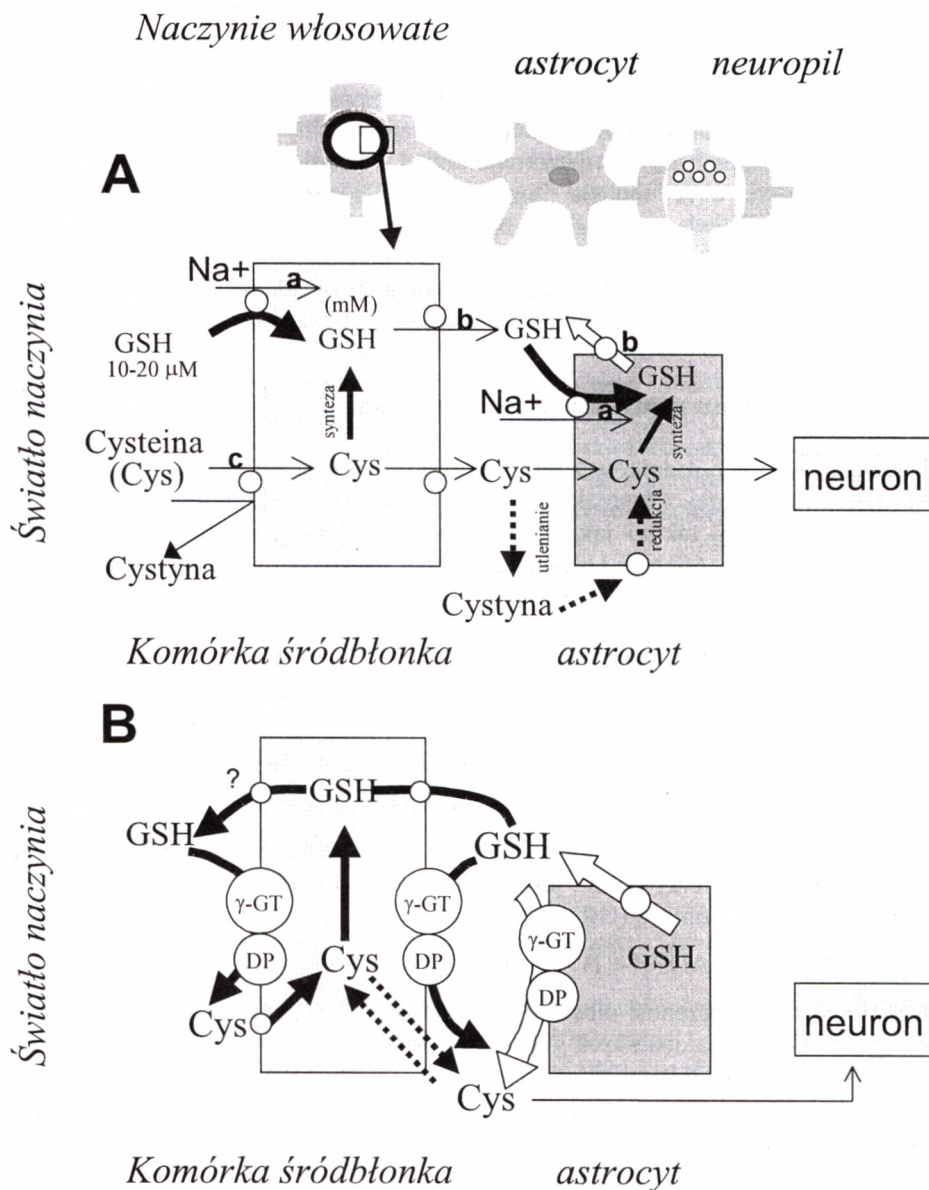
Uszkodzone mitochondria nie są w stanie produkować odpowiedniej ilości energii, a niski poziom ATP ma bezpośredni wpływ na biosyntezę GSH (patrz podrozdział 5.2.5.1). Przedstawioną powyżej w formie schematu zależność między poziomem GSH, produkcją reaktywnych form tlenu i uszkodzeniem mitochondriów, można rozpatrywać w aspekcie choroby Parkinsona. W schorzeniu tym dochodzi bowiem zarówno do spadku poziomu GSH [3, 4], jak i do zaburzenia funkcji mitochondriów [51, 52].

5.2.3. Transport glutationu przez barierę krew–mózg

Podczas krótkotrwałego głodzenia organizmu mózg jest chroniony przed utratą glutationu [53]. W warunkach takich homeostaza glutationowa jest przypuszczalnie utrzymywana przez obrót w tkance mózgowej aminokwasów budujących cząsteczkę tego peptydu. Zarówno cysteina, jak i glutamina jako substancje prekursorowe służące do biosyntezy GSH, mogą być aktywnie przenoszone przez barierę krew–mózg za pomocą odpowiedniego systemu transportowego [54, 55]. Ostatnio opisano również wychwyt GSH z krwi przez komórki śródbłonka naczyń kapilarnych oraz stwierdzono, że przechodzi on z tych komórek do parenchymy mózgu [56, 57]. Nie jest jednak całkowicie jasne, czy GSH jest transportowany z surowicy krwi w formie całej cząsteczki peptydu, czy też jego wychwyt jest związany z biodegradacją GSH przez enzym błonowy, γ -glutamylotranspeptydazę (γ -GT), zlokalizowany na powierzchni błony cytoplazmatycznej śródbłonka naczyń włosowatych [58, 59]. Ryc. 2 (A, B) przedstawia hipotetyczne drogi transportu GSH przez barierę krew–mózg.

Wyniki najnowszych badań wskazują, że w mózgu podobnie jak w innych organach (jelita, płuca) możliwy jest bezpośredni transport cząsteczek GSH z surowicy krwi przez ścianę naczyń włosowatych (ryc. 2A). Transport ten jest niezależny od aktywności γ -GT i odbywa się przy udziale specjalnych nośników białkowych, które umiejscowione są w błonie cytoplazmatycznej śródbłonka naczyń włosowatych [60, 61]. Przyjmuje się, że istnieją co najmniej dwa rodzaje transporterów przenoszących cząsteczki GSH ze światła naczyń krwionośnych do tkanki mózgowej. Aktywność jednego z nich jest wyraźnie zależna od obecności jonów sodu [60, 61]. Transporter GSH zależny od kationów Na^+ znajduje się w błonie cytoplazmatycznej śródbłonka, skierowanej do światła naczynia kapilarnego. Przy jego udziale może dochodzić do gromadzenia się w tych komórkach GSH pobranego z surowicy krwi (model A, ryc. 2). Istnienie transportera sodowozależnego zostało ostatecznie stwierdzone w badaniach *in vitro*, przeprowadzonych na specjalnej linii ludzkich komórek śródbłonka naczyń włosowatych [62]. Kannan i współpracownicy [62] potwierdzili następnie istnienie transportera sodowozależnego dla GSH również w błonach cytoplazmatycznych astrocytów ludzkich pochodzących z pierwotnych hodowli. Wcześniej transporter sodowozależny został wykryty w błonach astrocytów szczura [63, 64]. Drugi transporter GSH, którego aktywność nie jest zależna od obecności jonów Na^+ , znajduje się w błonie podstawnej komórek śródbłonka naczyń włosowatych oraz w błonie cytoplazmatycznej astrocytów. Transporter ten ułatwia odbywający się zgodnie z gradientem stężeń (wysokie stężenie GSH w komórce, niskie zewnątrzkomórkowo) wypływ GSH z tych komórek (model A, ryc. 2). Schemat A na ryc. 2 przedstawia ponadto transport cysteiny (Cys) i cystyny oraz uwzględnia syntezę GSH w komórkach śródbłonka i astrocytach.

Możliwość bezpośredniego transportu GSH przy udziale nośników nie wyklucza jednak enzymatycznego rozpadu tego peptydu i wychwytu powstałych aminokwasów przez komórki śródbłonka naczyń włosowatych, w których ponownie dochodzi do biosyntezy GSH (model B, ryc. 2). Zauważono, że wypływ GSH z komórek śródbłonka oraz astrocytów odbywa się w tych samych miejscach błony cytoplazmatycznej, gdzie zlokalizowane są enzymy degradujące ten peptyd, czyli γ -GT i dipeptydaza (DP) (ryc. 2B). To bezpośrednie sąsiedztwo zapewnia dostęp substratu, jakim jest GSH, do aktywnych centrów obu tych enzymów i prowadzi do szybkiego powstania produktów hydrolizy, głównie cysteiny. Szczególnie ważne w tym współdziałaniu transportera



Ryc. 2. Hipotetyczne modele transportu GSH w mózgu. Model A – szybki, bezpośredni transport GSH przy udziale nośników: a – transporter Na^+ -zależny; b – transporter niezależny od jonów Na^+ ; c – transporter aminokwasów. Model B – wolny, zależny od aktywności γ -GT i dipeptydazy (DP) transport aminokwasów uwolnionych podczas rozpadu GSH. Transport cystyny powstającej w wyniku zewnątrzkomórkowego utleniania cysteiny (Cys) zaznaczony jest linią przerywaną (rycina A) (wg Kannana i wsp. 1998 [75] – zmodyfikowane)

wspomagającego wypływ GSH z enzymami katalizującymi jego hydrolizę jest ciągle uwalnianie cysteiny, która jako jedyny aminokwas siarkowy jest następnie pobierana przez neurony. W przeciwieństwie do cysteiny cystyna nie jest pobierana przez neurony. Według Sagara i współpracowników [39], cystyna powstająca w przestrzeni międzykomórkowej w wyniku bardzo szybkiej autooksydacji cysteiny jest wychwytywana przez astrocyty, w których podlega wewnątrzkomórkowej redukcji (ryc. 2A).

Przedstawione powyżej modele transportu GSH przez barierę krew–mózg zostały opracowane na podstawie najnowszych badań. Nadal jednak pozostaje do wyjaśnienia, jak duży jest udział transporterów GSH w dostarczaniu tego peptydu z krwi do mózgu i w utrzymywaniu homeostazy glutationowej w tym organie. Wiadomo bowiem, że możliwości transportu tego peptydu przez barierę krew–mózg spadają wraz z wiekiem [56, 60].

5.2.4. Rola glutationu w procesach detoksyfikacji

Usuwanie wolnych rodników z udziałem GSH odbywa się na drodze enzymatycznej i nieenzymatycznej. W reakcji nieenzymatycznej GSH reaguje bezpośrednio z wolnymi rodnikami, takimi jak: anionrodnik nadtlenny, rodnik hydroksylowy oraz tlenek azotu [65, 66, 67]. Usuwanie rodnika hydroksylowego tą drogą jest jedną z ważniejszych funkcji GSH w układzie nerwowym (reakcja 1).



W reakcji enzymatycznej, katalizowanej przez peroksydazę glutationową (GPx) [EC 1.11.1.9], GSH jest donorem elektronów do redukcji nadtlenników. Tą drogą usuwany jest nadtlenek wodoru oraz wodoronadtlenki organiczne (reakcja 2).



Końcowym produktem tych reakcji jest disiarczek glutationu (GSSG) i cząsteczka wody. W obrębie komórki GSSG jest redukowany do GSH w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową (GR) (reakcja 3).



GR [EC 1.6.4.2] przenosi elektrony z fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) na disiarczek glutationu i w ten sposób odnawia pulę zredukowanego GSH. W reakcjach katalizowanych przez GPx i GR (reakcje 2 i 3) glutation nie jest zużywany, lecz ulega ciągłej regeneracji. Do efektywnej detoksyfikacji nadtlenników z udziałem GPx i GR konieczna jest dostępność i regeneracja NADPH. Podobnie jak w innych tkankach organizmu regeneracja NADPH odbywa się głównie w cyklu pentozofosforanowym, w którym w mózgu ulega przemianie zaledwie od 3 do 5% glukozy. Cykl ten ma jednak bardzo duże znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania mózgu właśnie ze względu na powstający w nim NADPH, który jest niezbędny w usuwaniu nadtlenników. Jak wynika z badań prowadzonych na hodowlach astrocytów, szlak pentozofosforanowy jest bardzo silnie pobudzany podczas detoksyfikacji nadtlennika wodoru [68, 69]. Z kolei niedobór glukozy w płynach hodowlanych obniża zdolności astrocytów do usuwania nadtlennika wodoru [70] i znacznie wydłuża czas usuwania wodoronadtlenków organicznych [71, 72].

Komórki mózgu różnią się pod względem możliwości usuwania wolnych rodników. Hodowane astrocyty bardzo efektywnie redukują zarówno nadtlenek wodoru [70, 73], jak i wodoronadtlenki organiczne [71, 72, 74]. W komórkach tych oprócz GPx także katalaza [EC 1.11.1.6] jest zaangażowana w usuwanie nadtlenu wodoru [70, 73]. Zahamowanie samej katalazy tylko w nieznacznym stopniu obniża zdolności astrocytów do usuwania nadtlenu wodoru, natomiast równoczesne zahamowanie GPx bardzo silnie ogranicza możliwości detoksyfikacyjne tych komórek [70]. Oznacza to, że GPx w astrocytach może zastąpić funkcję katalazy w usuwaniu nadtlenu wodoru, natomiast katalaza nie może zastąpić GPx w usuwaniu wodoronadtlenków organicznych, takich jak wodoronadtlenek t-butyłu lub wodoronadtlenek kumenu [71, 72]. W przeciwieństwie do astrocytów neurony w hodowli mają znacznie słabszą zdolność detoksyfikacji nadtlenu wodoru [73, 75]. W komórkach tych w obronie przed nadtlaniem wodoru uczestniczy głównie GPx [73], jednakże system glutationowy neuronów nie może w pełni zrekompensować utraty aktywności enzymatycznej katalazy [75].

W układzie nerwowym astrocyty są w bardzo bliskim kontakcie z neuronami. Wypustki astrocytów tworzą niemal ciągłą błonę wokół ciał komórkowych i wypustek neuronalnych. Takie anatomiczne usytuowanie astrocytów w stosunku do neuronów sprzyja wymianie metabolitów pomiędzy tymi komórkami. W hodowlach astrogliono-neuronalnych (*astroglial-neuron coculture*) astrocyty chronią neurony przed szkodliwym działaniem zarówno nadtlenu wodoru [73, 76], jak i tlenu azotu [77]. Według badań Desagher i współpracowników [73] 1 astrocyt może zapewnić efektywną obronę przed nadtlaniem wodoru nawet 20 neuronom. Astrocyty zapobiegają również uszkodzeniom neuronów przez zewnątrzkomórkowe wolne rodniki znajdujące się w płynach hodowlanych [78]. Dane te wskazują, że między astrocytami a neuronami istnieje metaboliczna interakcja ograniczająca toksyczność wolnych rodników względem neuronów [79, 80, 81]. W interakcji tej uczestniczy GSH, gdyż neuroprotektoryjne działanie astrocytów skierowane przeciw nadtlankowi wodoru i tlankowi azotu ulega osłabieniu, gdy poziom GSH w tych komórkach jest niski [77, 80].

5.2.4.1. Rozmieszczenie enzymów katalizujących reakcje detoksyfikacji w mózgu

Właściwości biochemiczne enzymów, biorących udział w procesach detoksyfikacji mózgu, są intensywnie badane. W ostatnich latach poznano 4 izoenzymy GPx zawierające w swoich centrach aktywnych selenocysteinę [82], jak również zidentyfikowano formę tego enzymu pozbawioną selenu [83]. Enzymatyczna aktywność zarówno GPx, jak i GR, badana w homogenatach tkankowych, jest znacznie niższa w mózgu niż w innych tkankach organizmu. I tak, aktywność formy cytozolowej GPx w mózgu myszy stanowi zaledwie 5% aktywności tego enzymu, jaką charakteryzują się komórki nerek i wątroby. Podobnie aktywność GR w mózgu myszy stanowi odpowiednio 32% i 65% aktywności tego enzymu w nerkach i wątrobie [84]. Jak wykazują badania immunohistochemiczne prowadzone na skrawkach mózgu, rozmieszczenie enzymu peroksydazy glutationowej w różnych typach komórek jest silnie zróżnicowane i zależy zarówno od badanego gatunku, jak i od stanu fizjologicznego mózgu. W pierwszych badaniach tego typu, prowadzonych na skrawkach mózgu szczura, enzym ten znaleziono głównie w neuronach kory, hipokampa i mózdzku [85]. Przeciwnie, w badaniach wykonanych na skrawkach mózgu szczura w ostatnich latach wykazano obecność tego

enzymu głównie w komórkach mikrogleju, a stosunkowo niewielką jego ilość stwierdzono w neuronach, astrocytach i neuropilu [86]. W mózgu myszy obecność GPx stwierdzono zarówno w neuronach, jak i astrocytach. Wysokie stężenie tego enzymu obserwowano w neuronach warstwy II kory mózgowej, w rejonie CA1 hipokampa, w zwoju zębatym i w jądrze mostu [87]. W przeciwieństwie do gryzoni, w mózgu człowieka Takizawa i współpracownicy [88] opisali bardzo małą ilość GPx zarówno w neuronach, jak i astrocytach, a Damier i współpracownicy [89] wykazali obecność tego enzymu wyłącznie w komórkach glejowych. W stanach patologicznych u człowieka obserwuje się zwiększoną koncentrację GPx w komórkach glejowych sąsiadujących z miejscem zawału mózgu [86], a w przypadku choroby Parkinsona w komórkach glejowych otaczających nieliczne, zachowane neurony dopaminowe w części zbitej istoty czarnej [89]. Lokalizacja GPx w różnych typach komórek mózgu w chwili obecnej nie jest w pełni wyjaśniona i wymaga dalszych badań.

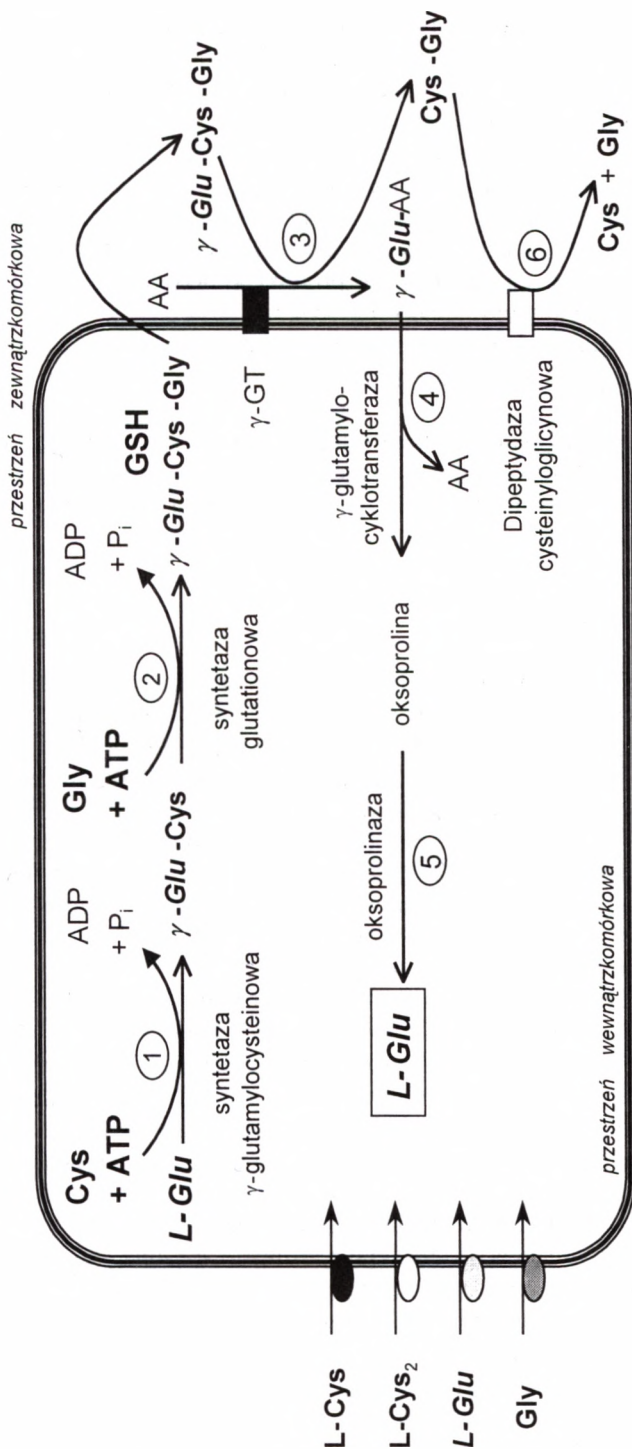
Struktura, funkcja i mechanizm działania reduktazy glutationowej (GR) zostały dokładnie opisane przez Lopez-Barea i współpracowników [90]. Występująca w mózgu forma tego enzymu jest dimerem zbudowanym z identycznych podjednostek. Masa cząsteczkowa każdego monomeru wynosi około 50 kDa, wartość stałej Michaelisa K_M wyizolowanego enzymu GR względem jego substratów, czyli NADPH i GSSG, waha się w granicach mikromolowych [91]. Reduktazę glutationową wykryto na skrawkach mózgu metodą immunohistochemiczną głównie w neuronach. Obecność tego enzymu w astrocytach jest znacznie słabiej zaznaczona i w dużym stopniu zależy od badanego gatunku [92]. W hodowanych astrocytach w najlepszym przypadku stwierdzano bardzo niewielką ilość tego enzymu, podczas gdy w hodowanych neuronach, komórkach mikrogleju i oligodendrocytach wysoką [91].

W komórkach mózgu zachodzą reakcje enzymatyczne, których przebieg może prowadzić do wyczerpania się wewnątrzkomórkowej puli GSH. W reakcjach tych biorą udział S-transferazy glutationowe [EC 2.5.1.18], należące do grupy enzymów cytozolowych katalizujących koniugację elektrofilowych ksenobiotyków z GSH. Efektem działania tych enzymów jest usunięcie z komórek mózgu nie tylko szkodliwych substancji, ale także utrata samego GSH [93]. Występujące w mózgu izoformy S-transferaz glutationowych przynależą do trzech różnorodnych klas – α , μ i π [94]. Klasa- α znajduje się w astrocytach, neuronach i komórkach ependymy [95], klasa- μ w neuronach i astrocytach [95, 96], a klasa- π wyłącznie w oligodendrocytach [96, 97].

5.2.5. Podstawowy metabolizm glutationu

5.2.5.1. Synteza glutationu

GSH jest peptydem syntetyzowanym we wszystkich typach komórek mózgu [98]. Synteza jego odbywa się w podobny sposób jak w innych tkankach organizmu w cytozolu komórki w dwustopniowej reakcji przebiegającej z udziałem zależnych od ATP enzymów: syntetazy γ -glutamylcysteinowej [EC 6.3.2.2] oraz syntetazy glutationowej [EC 6.3.2.3] (ryc. 3). Podstawowymi substratami do syntezy GSH są trzy aminokwasy: kwas L-glutaminowy, L-cysteina i glicyna. W pierwszym etapie reakcji syntezy, katalizowanym przez syntetazę γ -glutamylcysteinową, zostaje utworzone wiązanie peptydowe pomiędzy grupą γ -karboksylową glutaminianu a grupą aminową cyste-



Ryc. 3. Synteza i rozpad GSH. AA – akceptor aminokwasowy; ATP – adenozyno-5'-fosforan; ADP – adenozyno-5'-difosforan; L-Cys – cysteina; L-Glu – glutaminian; Gly – glicyna; Cys₂ – cystyna; γ -Glu-AA – aminokwas γ -glutamyłowy; γ -GT – γ -glutamylotranspeptydaza; P_i – fosforan nieorganiczny

iny (ryc. 3, reakcja 1). Warunkiem utworzenia tego wiązania jest aktywacja grupy γ -karboksylowej glutaminianu kosztem adenosynotrójfosforanu (ATP). Powstały związek pośredni acylofosforan jest z kolei atakowany przez grupę aminową cysteiny. W wyniku reakcji powstaje dipeptyd γ -glutamylcysteina (γ -Glu-Cys). W drugim etapie, katalizowanym przez syntetazę glutationową (reakcja 2), ATP atakuje grupę karboksylową cysteiny, aby umożliwić jej kondensację z grupą aminową glicyny. Reakcje syntezy wymagają nakładu energii i podczas ich przebiegu zużywane są 2 cząsteczki ATP na 1 cząsteczkę powstającego GSH. Synteza GSH jest regulowana poprzez negatywne sprzężenie zwrotne, co oznacza, że produkt końcowy, czyli GSH, hamuje aktywność syntetazy γ -glutamylcysteinowej i wyłącza syntezę [25, 99]. Z kolei nadmiar glutaminianu blokując miejsce regulatorowe syntetazy γ -glutamylcysteinowej, może odhamować negatywne sprzężenie zwrotne i ponownie nasilić biosyntezę GSH [99].

Specyficzna aktywność enzymów syntetyzujących GSH w całym mózgu jest znacznie niższa niż ta, którą obserwowano w komórkach nerek czy wątroby [100, 101]. Jedynie w splocie naczyniastym [102, 103] i w astrocytach [104] aktywność tych enzymów jest szczególnie wysoka.

5.2.5.2. Katabolizm glutationu

Chociaż GSH jest syntetyzowany wewnątrz komórki, jego rozpad zachodzi poza jej obrębem, w przestrzeni międzykomórkowej. Enzymami katalizującymi hydrolizę GSH są γ -glutamylotranspeptydaza (γ -GT) [EC 2.3.2.2] oraz dipeptydaza cysteinylglicynowa [EC 3.4.13.6] (DP). Enzymy te to białka błonowe zlokalizowane wyłącznie na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej określonych typów komórek. Oddzielenie błoną komórkową GSH jako substratu od enzymów biorących udział w jego rozpadzie gwarantuje wewnątrzkomórkową stabilność tego peptydu, jak również determinuje określony mechanizm pozwalający na przemieszczanie go z cytozolu na zewnątrz komórki. Wpływ GSH z komórki jest krokiem inicjującym jego degradację i obserwowano go w hodowlach astrocytów [63, 64, 105].

Uwolniony do przestrzeni międzykomórkowej GSH podlega rozpadowi w dwustopniowej reakcji (ryc. 3). W pierwszym etapie reakcji katalizowanym przez γ -GT, enzym ten przerywa wiązanie γ -karboksylowe w cząsteczce GSH i przenosi resztę γ -glutamylową na akceptor aminokwasowy (AA), inny peptyd lub cząsteczkę wody. Powstaje wtedy aminokwas γ -glutamylowy lub peptydy γ -glutamylowe (γ -Glu-AA) oraz dipeptyd cysteinylglicyna (Cys-Gly) (ryc. 3, reakcja 3). Aminokwas γ -glutamylowy wraca do komórki, gdzie γ -glutamylcyklotransferaza przekształca resztę γ -glutamylową w 5-okso-L-prolinę, uwalniając aminokwas (AA), który w poprzedniej reakcji był jej akceptorem (reakcja 4). Następnie, 5-okso-L-prolina jest przekształcana z powrotem do glutaminianu przy udziale zależnego od ATP enzymu – 5-okso-L-prolinazy (reakcja 5). W drugim etapie reakcji rozpadu GSH, dipeptyd Cys-Gly ulega dalszej degradacji do glicyny i cysteiny pod wpływem dipeptydazy cysteinylglicynowej (reakcja 6). Powstałe drogą enzymatycznego rozpadu GSH aminokwasy (glutaminian, cysteina, glicyna) mogą być resorbowane przez komórki mózgu i używane do ponownej syntezy tego peptydu (reakcje 1 i 2).

Występowanie peptydów γ -glutamylowych [106, 107] potwierdza obecność w mózgu γ -GT. Enzym ten został wyizolowany z mózgu szczura i opisano kilka jego izoform [108]. Specyficzna aktywność tego enzymu wykazuje dużą zmienność w różnych obszarach mózgu, przy czym najwyższą charakteryzuje się spłot naczyniasty [102, 103]. Komórkowe rozmieszczenie γ -GT w naczyniach kapilarnych mózgu jest przedmiotem kontrowersji. Pewne badania wskazują na obecność tego enzymu w błonie cytoplazmatycznej komórek śródbłonka [58, 59], inne natomiast sugerują, że głównym źródłem γ -GT w naczyniach włosowatych mogą być perycyty [109]. Immunohistochemiczne badania porównawcze wykonane na skrawkach pochodzących z mózgu szczura, myszy, małpy i człowieka wskazują na różnice gatunkowe. U szczura obecność γ -GT stwierdzono na powierzchni komórek śródbłonka naczyń włosowatych, natomiast u człowieka i myszy na powierzchni astrocytowych stópek końcowych przylegających do naczyń włosowatych [110]. Obecność γ -GT na wypustkach astrocytów przylegających do naczyń włosowatych, jak również na powierzchni perycytów pokrywających śródbłonek naczyń włosowatych wskazuje na specyficzną funkcję tego enzymu w mózgu.

Dotychczas postulowano, że zarówno GSH, jak i aktywność γ -GT w naczyniach włosowatych mózgu odgrywają główną rolę w transporcie aminokwasów przez barierę krew-mózg [111]. Obecnie wydaje się, iż koncepcja ta nie jest w pełni słuszna i powinna ulec weryfikacji. Ostatnio okazało się bowiem, że nawet transport cystyny, jednego z najlepszych substratów γ -GT [112] z surowicy krwi do komórek naczyń włosowatych przebiega normalnie przy zahamowanej aktywności γ -GT [113]. Dlatego wydaje się, że funkcję tego enzymu w naczyniach kapilarnych mózgu można by raczej łączyć z naczyniowym metabolizmem GSH. Stąd też koncepcję transportu aminokwasów za pomocą γ -GT zastępuje się obecnie hipotezą uwzględniającą udział tego enzymu w procesach detoksyfikacji mózgu (szlak kwasu merkapturowego) i katabolizmie leukotrienów (LT) C_4 [109]. Mimo to utrzymuje się nadal pogląd, że pewne substancje powstające w cyklu γ -glutamylowym mogą pełnić funkcje regulatorowe w transporcie aminokwasów [114]. Do nich należy aminokwas 5-okso-L-prolina, który powstaje w tym cyklu i aktywuje odpowiednie systemy transportu aminokwasów typu $B^{0,+}$ i A w błonie podstawnej komórek śródbłonka naczyń włosowatych mózgu [115]. Wewnątrzkomórkowe stężenie 5-okso-L-proliny jest regulowane przez enzym 5-okso-L-prolinazę, który metabolizuje ten aminokwas do glutaminy. Ostatnio enzym ten został również odkryty w komórkach śródbłonka i perycytach naczyń włosowatych [116].

5.2.5.3. Hodowle komórkowe jako model do badań metabolizmu glutationu w mózgu

Komórki mózgu różnią się między sobą zarówno pod względem morfologicznym, jak i metabolicznym. Dotychczasowe badania metabolizmu GSH w różnych typach komórek mózgu były prowadzone głównie na pierwotnych kulturach zawierających tylko jeden ich rodzaj i dotyczyły zwłaszcza astrocytów. Znacznie mniej jest dostępnych informacji na temat metabolizmu GSH w neuronach, oligodendrocytach i komórkach mikrogleju.

5.2.5.3.1. Astrocyty

Stężenie GSH w hodowanych astrocytach jest stosunkowo wysokie i wynosi od 8 do 20 mM [38, 117]. Może ono jednak ulegać zmianom pod wpływem różnych czynników modulujących (tab. 1).

Stężenie GSH w hodowanych astrocytach obniża się pod wpływem inhibitora syntetazy γ -glutamylcysteinowej butioninosulfoksyminy (BSO) oraz związków reagujących z GSH, takich jak kwas etakrynowy czy dietylomaleinian oraz czynników stresowych, takich jak głodzenie i niedokrwienie. Poziom GSH w astrocytach wzrasta po wprowadzeniu do płynów hodowlanych prekursorów służących do jego syntezy, a także pod wpływem czynników zwiększających wychwyt cystyny [63] lub po inkubacji tych komórek z induktorem syntezy tego peptydu – ditiolotionem anetolu (ADT) [75].

Astrocyty nie tylko gromadzą duże ilości GSH, ale także aktywnie go syntetyzują [64]. W komórkach tych aktywność syntetazy γ -glutamylcysteinowej jest znacznie wyższa niż w neuronach [104]. Jak wcześniej wspomniano (podrozdział 5.2.5.1), biosynteza GSH jest regulowana na zasadzie negatywnego sprzężenia zwrotnego, co oznacza, że rozpoczęcie reakcji jest zależne od wewnątrzkomórkowego stężenia tego tripeptydu. Dlatego też badania nad potencjalnymi prekursorami GSH były prowadzone na hodowlach astrocytów, w których głodzeniem wywoływano niedobór tego peptydu [37, 117]. W warunkach takich czynnikiem ograniczającym biosyntezę GSH okazała się dostępność glutaminianu. Zamiast glutaminianu astrocyty mogą dodatkowo wykorzystywać do biosyntezy GSH również glutaminę, asparaginian, asparaginę, ornitynę lub prolinę jako donory reszty glutaminianowej [37]. Donorem cysteiny, drugiego podstawowego aminokwasu budującego cząsteczkę GSH, może być N-acetylocysteina (NAC), cystationina lub kwas 2-oksotiazolidyno-4-karboksylowy (OTC). Funkcji takiej nie może natomiast pełnić metionina [118]. Jednak najlepszym źródłem cysteiny dla astrocytów wydaje się cystyna [118, 119], natomiast reszta glicynowa może pochodzić z egzogennej glicyny lub seryny [120].

Tabela 1

Czynniki modulujące stężenie GSH w hodowanych astrocytach

Substancja	Efekt	Piśmiennictwo
Butioninosulfoksymina (BSO)	↓	Barker i współprac. [49], Dringen i Hamprecht [70]
Dietylomaleinian	↓	Desagher i współprac. [73], Juurlink i współprac. [123], Yudkoff i współprac. [64]
Kwas etakrynowy	↓	Huang i Philbert [124]
Alkohol etylowy	↓	Montoliu i współprac. [125]
Ischemia	↓	Juurlink i współprac. [126]
Tlenek azotu	↓	Garcia-Nogales i współprac. [127]
Głodzenie	↓	Dringen i Hamprecht [37], Dringen i współprac. [75]
ADT	↑	Dringen i współprac. [75]
L-dopa	↑	Han i współprac. [128]
γ -Glu-Cys	↑	Pileblad i współprac. [40]
Glutaminian	↑	Dringen i Hamprecht [37]
OTC	↑	Aschner i współprac. [129]
1,25-dihydroksyvitamina D ₃	↑	Garcion i współprac. [130]

↑ – wzrost, ↓ – spadek

Oprócz aminokwasów komórki astrogleju mogą wykorzystywać również dipeptydy jako prekursory do syntezy GSH [117]. Dipeptyd γ -glutamylcysteina (γ -Glu-Cys) jest wychwytywany przez astrocyty w stężeniach milimolowych i służy za bezpośredni substrat dla syntetazy glutationowej. W tym przypadku biosynteza GSH przebiega szybciej, gdyż pierwszy etap reakcji z udziałem syntetazy γ -glutamylcysteinowej zostaje pominięty [121]. Drugi dipeptyd, cysteinylglicyna (Cys-Gly), będący produktem rozpadu GSH pod wpływem γ -GT, może być również wykorzystywany przez astrocyty, nawet wtedy gdy znajduje się w płynach hodowlanych w stężeniach mikromolowych [121]. Za jego wychwyt odpowiedzialny jest transporter peptydowy PepT2 [122]. W cytozolu astrocytów Cys-Gly ulega rozpadowi, a uwolnione aminokwasy są wykorzystywane do resyntezy GSH.

5.2.5.3.2. Neurony

W hodowlach *in vitro* neurony zawierają znacząco mniej GSH niż astrocyty [38, 104, 131]. W tab. 2 przedstawiono wykaz substancji modulujących poziom GSH w neuronach.

Tabela 2

Substancje modulujące stężenie GSH w hodowanych neuronach

Substancja	Efekt	Piśmiennictwo
Białko β -amyloidu	↓	Müller i współpr. [132]
Butioninosulfoksymina (BSO)	↓	Wüllner i współpr. [46]
Kwas etakrynowy	↓	Wüllner i współpr. [46]
Glutaminian	↓	Almeida i współpr. [133]
Haloperidol	↓	Sagara [134]
Cys-Gly	↑	Dringen i współpr. [135]
Cysteina	↑	Sagara i współpr. [136], Kranich i współpr. [119]
γ -Glu-Cys	↑	Pileblad i współpr. [40], Dringen i współpr. [135]
NAC	↑	Dringen i Hamprecht [137]

↑ – wzrost, ↓ – spadek

Stężenie cysteiny i jej prekursorów w medium hodowlanym determinuje poziom GSH w tych komórkach. Neurony nie są zdolne do pobierania cystyny obecnej w większości płynów hodowlanych, są zatem zależne od dostępności cysteiny, która bardzo łatwo ulega utlenieniu do cystyny [119, 136]. Oprócz zredukowanej cysteiny neurony mogą również korzystać z takich prekursorów, jak: cysteinylglicyna (Cys-Gly), γ -glutamylcysteina (γ -Glu-Cys) oraz N-acetylcysteina (NAC) [40, 121, 135, 137]. Obecność OTC i metioniny nie podnosi poziomu GSH w neuronach mózgu [137]. W przeciwieństwie do cysteiny dostępność glutaminianu i glicyny nie ogranicza biosyntezy GSH w neuronach [135]. Stężenie GSH w hodowanych neuronach ulega obniżeniu pod wpływem BSO, β -amyloidu, agonistów receptorów glutaminianergicznych, kwasu etakrynowego oraz haloperidolu – leku stosowanego w leczeniu schizofrenii (tab. 2).

5.2.5.3.3. Oligodendrocyty

Oligodendrocyty są komórkami zawierającymi małą ilość GSH oraz wysokie stężenie jonów żelaza [123, 138] i przypuszczalnie dlatego są bardzo podatne na uszkadzające działanie wolnych rodników [139, 140]. Komórki te w hodowli przeżywają tylko w obecność cysteiny lub cystyny, natomiast przy braku tych aminokwasów następuje spadek poziomu GSH i oligodendrocyty giną. Do śmierci tych komórek nie dochodzi w obecności zmiataczy wolnych rodników [140, 141] lub donora tlenu azotu o długim okresie półtrwania [142]. Toksyczne działania nadtlenu wodoru względem oligodendrocytów może być częściowo znoszone podaniami NAC [143]. Dane te wskazują, że udział GSH w detoksyfikacji wolnych rodników ma zasadnicze znaczenie dla przeżywalności oligodendrocytów w hodowlach.

5.2.5.3.4. Mikroglej

Komórki mikrogleju są nieodłącznym składnikiem hodowli astrocytów, w których stanowią mniejszość. Komórki te charakteryzują się największą zawartością GSH [144] i spośród różnych typów hodowanych komórek glejowych barwią się najbardziej intensywnie na obecność białka reduktazy glutationowej [91]. Z pierwotnych kultur astrocytów wyprowadzono hodowle wtórne, w których komórki mikrogleju stanowiły od 80 do 90% wszystkich komórek. Takie specyficzne hodowle komórek mikroglejowych, w porównaniu z hodowlami neuronów i astrocytów, charakteryzowały się wyższą aktywnością właściwą zarówno peroksydazy, jak i reduktazy glutationowej, natomiast niższą katalazy [145]. Komórki mikrogleju w odpowiedzi na aktywację uwalniają anionorodnik ponadtlenkowy [146] oraz tlenek azotu [147], czyli wykazują bezpośredni kontakt z tymi reaktywnymi cząsteczkami, które same generują. Dlatego też system glutationowy w komórkach mikrogleju może mieć zasadnicze znaczenie dla obrony przed tymi właśnie rodnikami. GSH reaguje bowiem bezpośrednio, nieenzymatycznie zarówno z NO, jak i z anionorodnikiem ponadtlenkowym [65, 66, 67]. Jest on również, o czym była mowa wcześniej (podrozdział 5.2.2.1 i 5.2.4), donorem elektronów w katalizowanej przez GPx reakcji redukcji nadtlenu wodoru i toksycznego nadtlenoazotynu [148], powstającego spontanicznie w reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym.

5.2.5.4. Interakcja metaboliczna między astrocytami a neuronami

Astrocyty syntetyzują, gromadzą i uwalniają GSH, dlatego też postuluje się, że są one komórkami dostarczającymi ten tripeptyd neuronom [64]. Istnienie metabolicznej interakcji między neuronami a astrocytami wydają się potwierdzać dane eksperymentalne [81, 135, 149]. Te dwa typy komórek nie współzawodniczą o prekursor do syntezy glutationu [119], jednakże dostępność cysteiny ma znaczący wpływ na stężenie tego peptydu w neuronach. Obecność astrocytów utrzymuje [39], a nawet podnosi poziom GSH w hodowanych neuronach, natomiast ich brak prowadzi do spadku jego stężenia w tych komórkach [135, 149]. Wyniki te sugerują, że co najmniej jeden prekursor GSH musi być dostarczany przez astrocyty i ogranicza neuronalną biosyntezę GSH. Uwalnianie cysteiny przez astrocyty znajdujące się w płynie hodowlanym, za-

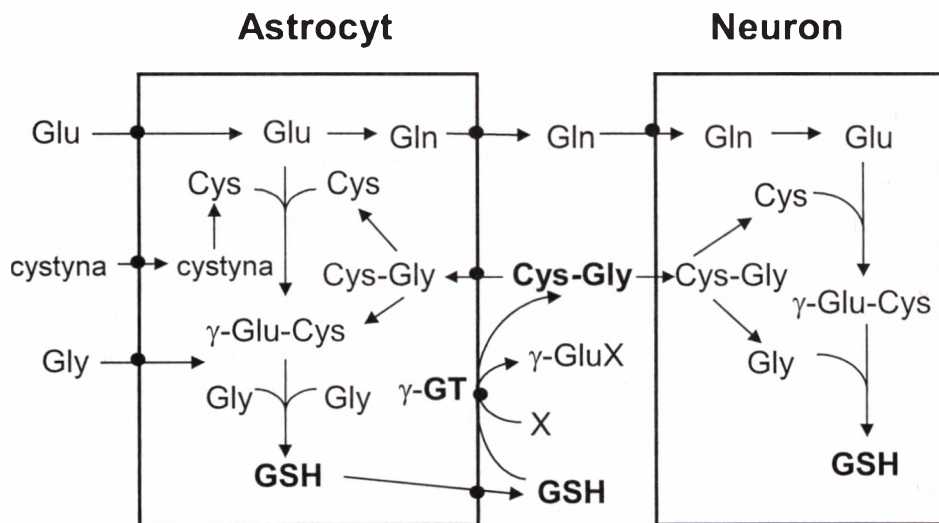
wierającym cystynę, zostało opisane przez Sagara i współpracowników [136]. Jednak pochodzenie uwolnionej cysteiny jest wciąż przedmiotem kontrowersji. Gdyby cysteina pochodziła z cystyny, w wyniku wewnątrzkomórkowej redukcji, jak sugeruje Sagar i współpracownicy [136], oznaczałoby to, że proces jej uwalniania przebiega wbrew gradientowi sodowemu. Takie uwalnianie cysteiny zakłócałoby jej naturalny sposób wychwytu z otaczającego środowiska, który w warunkach fizjologicznych odbywa się między innymi drogą kotransportu z kationami sodu przy udziale specyficznych transporterów aminokwasów i dipeptydów, a co za tym idzie uniemożliwiałoby wykorzystanie tego aminokwasu w hodowlach w stężeniu mikromolowym jako prekursora do syntezy GSH [37]. Dlatego też pojawienie się cysteiny w płynie hodowlanym, w którym utrzymywane są astrocyty, można by raczej tłumaczyć uwalnianiem i zewnątrzkomórkową hydrolizą GSH.

Bezpośredni transfer GSH z astrocytów do neuronów mógłby również tłumaczyć wzrost jego stężenia w neuronach znajdujących się we wspólnej hodowli, jednakże dotychczas nie wykazano bezpośredniego wychwytu przez neurony nienaruszonej cząsteczki tego peptydu [63]. Badania Dringena i współpracowników [135] prowadzone na hodowlach astrocytowo-neuronalnych wykazują, że dipeptyd Cys-Gly, powstający z zewnątrzkomórkowego GSH w reakcji katalizowanej przez γ -GT, bardzo efektywnie podnosi poziom GSH w hodowanych neuronach. Dipeptyd ten znacznie słabiej podnosi poziom GSH w hodowanych astrocytach, co oznacza, że jest on raczej specyficznym prekursorem służącym do syntezy GSH w neuronach. Blokada aktywności γ -GT przez specyficzny inhibitor aciwicynę, prowadzi do wybiórczego zahamowania wzrostu stężenia GSH w neuronach, nie wpływa natomiast na poziom GSH w astrocytach. Badania te wyraźnie wskazują, że synteza GSH w neuronach zależy od uwolnionego przez astrocyty GSH, z którego pod wpływem γ -GT powstaje dipeptyd Cys-Gly stanowiący podstawowy prekursor do tej syntezy. Z badań tych wynika, że aktywność γ -GT ma decydujące znaczenie w regulacji poziomu GSH w neuronach. Można zatem przypuszczać, że niska aktywności γ -GT lub jej zahamowanie przez specyficzne czynniki może prowadzić do zubożenia neuronalnej puli GSH, a w dalszej konsekwencji do osłabienia systemu obrony antyoksydacyjnej neuronów. Na ryc. 4 przedstawiono hipotetyczny schemat interakcji między astrocytem a neuronem w przebiegu metabolizmu GSH.

Nie wiadomo, czy Cys-Gly ulega dalszej zewnątrzkomórkowej degradacji do składowych aminokwasów, czy też rozpad zachodzi dopiero po wychwycie tego dipeptydu przez neuron. Drugi produkt hydrolizy GSH, czyli reszta γ -glutamylowa, jest przenoszona na akceptor, którym może być glutamina dostarczana przez astrocyty [150] lub cząsteczka wody. Glutamina jest prekursorem glutaminianu, niezbędnego substratu do syntezy GSH. Tak więc, astrocyty dostarczają neuronom oprócz Cys-Gly także glutaminę, czyli zapewniają komplet aminokwasów potrzebnych do biosyntezy GSH w neuronach.

Odkrycie interakcji metabolicznej między astrocytami a neuronami daje teoretyczne podstawy do opracowania metod modulacji stężenia GSH w neuronach. Jak wiadomo, stężenie GSH w astrocytach determinuje prędkość jego uwalniania [63]. Dlatego też terapie, które prowadziłyby do wzrostu poziomu GSH w astrocytach, równocześnie nasilałyby jego wypływ, a tym samym dostępność prekursorów do syntezy GSH w neuronach. Rola γ -GT polega na regulacji zewnątrzkomórkowego stężenia GSH oraz poziomu Cys-Gly. Ekspresja tego enzymu pozostaje pod kontrolą wielu czynni-

ków [151], które w różnych typach komórek nerwowych mogą również ulegać modulacji, np. w astrocytach 1,25-dihydroksyvitamina D_3 podnosi aktywność γ -GT [130, 152]. Wzrost aktywności γ -GT może prowadzić do zwiększenia stężenia Cys-Gly, a modulacja nieznanego jeszcze szlaku użytkowania tego dipeptydu przez neurony mogłaby mieć wpływ na stężenie GSH w neuronach.



Ryc. 4. Hipotetyczny schemat interakcji astrocyt-neuron w przebiegu metabolizmu GSH. Astrocyty używają różnych egzogennych substratów do syntezy GSH. Uwolniony z astrocytu GSH jest substratem dla ektoenzymu γ -GT. Cys-Gly powstająca pod wpływem γ -GT służy jako prekursor neuronalnego GSH. Glutamina (Gln) uwalniana przez astrocyt służy jako prekursor glutaminianu (Glu) potrzebnego do syntezy GSH. X – akceptor reszty γ -glutamyłowej przenoszony przez γ -GT z cząsteczki GSH. Nie wiadomo, czy hydroliza Cys-Gly, która jest przeznaczona do użytku wewnątrzneuronalnego, zachodzi w przestrzeni międzykomórkowej czy po jej wychwycie w neuronie. Gly – glicyna; Cys – cysteina; Cys-Gly – cysteinylglicyna; γ -Glu-Cys – γ -glutamylcysteina (wg Dringena [124] – zmodyfikowane)

5.3. Specyficzne funkcje zewnątrzkomórkowego glutationu w układzie nerwowym

Obecność GSH w mózgu w przestrzeni międzykomórkowej została potwierdzona w badaniach prowadzonych metodą mikrodializy [153, 154]. Jednakże, funkcja zewnątrzkomórkowego GSH nie została jasno określona i wiele jej aspektów pozostaje w sferze domysłów. Dotychczas uważano, że GSH jest przede wszystkim komórkowym antyutleniaczem katalizującym reakcje z udziałem peroksydazy glutationowej.

Oprócz udziału w tej reakcji, w przestrzeni międzykomórkowej reaguje on z rodnikami hydroksylowymi i aldehydowymi produktami peroksydacji lipidów, chroniąc w ten sposób błony komórkowe przed ich atakiem. Zewnątrzkomórkowy GSH jako substrat γ -GT prawdopodobnie służy również do detoksyfikacji glutaminianu, gdyż w warunkach eksperymentalnej ischemii obserwowano wzrost stężenia zewnątrzkomórkowego γ -glutamylglutaminianu oraz innych dipeptydów γ -glutamylowych [155].

Badania ostatnich lat prowadzone w trzech niezależnych ośrodkach (Japonia, Kanada, Finlandia) przy użyciu różnorodnych technik badawczych, obejmujących wiązanie znakowanych ligandów, synaptyczne uwalnianie i wychwyt oraz pomiary elektrofizjologiczne sugerują, że GSH może pełnić w mózgu funkcję zarówno neuromodulatora jonotropowych receptorów glutaminianergicznych, jak i nowego neuroprzekaźnika [156, 157, 158].

5.3.1. Uwalnianie cysteiny i glutationu w mózgu

W układzie nerwowym przekazywanie sygnałów między komórkami odbywa się za pomocą specyficznych cząsteczek, czyli neuroprzekaźników i neuromodulatorów. Są one uwalniane w sposób kontrolowany z wewnątrzkomórkowych kompartmentów do przestrzeni międzykomórkowych, skąd oddziałują na sąsiadujące komórki. Po wprowadzeniu do skrawków mózgu jonów potasu w stężeniu 50 mM dochodzi do depolaryzacji błon komórkowych i wapniowozależnego uwalniania związków. Uwalnianie takie może odbywać się pod wpływem bezpośrednio działającego czynnika indukującego depolaryzację lub w sposób pośredni, poprzez neuroaktywne substancje, uwolnione wcześniej na drodze depolaryzacji.

W kontekście tego rozumowania wykazano, że GSH występujący w mózgu w wysokim stężeniu od 1 do 3 mM na kilogram mokrej masy i w homogenie tkankowym znajduje się zarówno we frakcji synaptosomalnej, jak i cytozolowej. Przy czym we frakcji synaptosomalnej około 35% znajduje się tylko w synaptosomach, 41% w mitochondriach, a 21% w mielinie. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie GSH jest więc zbliżone do dystrybucji w komórce pobudzających aminokwasów glutaminianu i asparaginianu [159]. Cysteina uważana za prekursora GSH jest uwalniana w różnych obszarach mózgu, tak jak glutaminian i glicyna, czyli aminokwasy pełniące funkcje neuroprzekaźników [160]. Podobnie GSH jest uwalniany ze skrawków mózgu pod wpływem depolaryzacji, indukowanej wysokim stężeniem potasu, w sposób zależny od jonów wapnia [161]. Mechanizm tego uwalniania jak dotychczas nie został poznany. Fakt, że jest to proces zależny od obecności jonów Ca^{2+} sugeruje, iż może to być albo typowy mechanizm pęcherzykowy, charakterystyczny dla klasycznych neuroprzekaźników lub też wpływ GSH zachodzi pośrednio pod kontrolą uwalnianego neuroprzekaźnika. W mózgu szczura zarówno cysteina, jak i GSH są najbardziej intensywnie uwalniane w śródmózgowiu, międzymózgowiu, korze, hipokampie i prążkowie, a najslabiej w rdzeniu przedłużonym, moście i mózdzku [162]. W strukturach tych dochodzi do dwu- i trzykrotnego przekroczenia poziomu wypływu spoczynkowego, który wynosi kilka pikomoli na mg białka na minutę.

Badania prowadzone w skrawkach mózgu sugerują, że komórkami uwalniającymi GSH są neurony [161]. Z kolei badania na kulturach komórkowych, jak dotychczas, wskazują, że komórkami tymi są astrocyty [63, 64, 163]. Poziom uwalnianego GSH

przez hodowane astrocycy początkowo szacowano na podstawie jego stężenia w płynie hodowlanym. Oceny te były jednak zaniżone, gdyż nie uwzględniały aktywności γ -GT, tj. enzymu odpowiedzialnego za zewnątrzkomórkowy rozpad GSH. Gdy aktywność γ -GT zostaje zahamowana przez specyficzny inhibitor aciwi cynę, stężenie zewnątrzkomórkowego GSH stopniowo wzrasta. Według obliczeń Dringena [98], wskaźnik uwalniania GSH wynosi 2,1 nmol/(godz. x mg białka). Jest on zbliżony do wartości 3,2 nmol/(godz. x mg białka), tj. wskaźnika, który wcześniej obliczono [163] na podstawie kinetyki uwalniania tego peptydu z astrocytów [63]. Hodowane astrocycy uwalniają w ciągu 1 godz. około 10% wewnątrzkomórkowej puli GSH [163]. Równocześnie w komórkach tych odbywa się intensywna synteza tego peptydu. Biorąc po uwagę przytoczone powyżej wskaźniki uwalniania GSH, jak i 5-godzinny czas jego półtrwania w astrocycach, należy sądzić, że uwalnianie GSH jest procesem zużywającym największe ilości tego peptydu. Tempo uwalniania GSH z astrocytów zależy od jego wewnątrzkomórkowego stężenia i przebiega zgodnie z kinetyką Michaelis-Menten [63]. Jest ono częściowo hamowane przez preparaty rtęciowe, ale w przeciwieństwie do hepatocytów wątroby nie jest blokowane przez metioninę [98]. Wartość stałej K_M dla wypływu GSH z hodowanych astrocytów wynosi 36 mM [63] i jest o rząd wielkości wyższa od tej, jaką obliczono dla wypływu GSH z hepatocytów [164]. Dane te wskazują, że w hepatocytach i astrocycach istnieją odmienne mechanizmy uwalniania GSH. Astrocycy uwalniają GSH głównie w formie zredukowanej, nie można jednak wykluczyć, że komórki te są także zdolne do uwalniania formy utlenionej, czyli disiarczku (GSSG), jak to ma miejsce w przypadku innych tkanek.

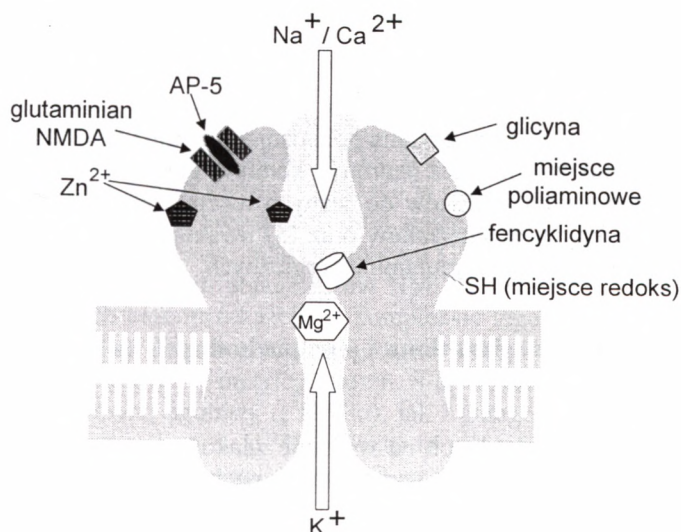
5.3.2. Klasyfikacja receptorów glutaminianergicznych

Przyjmuje się, że receptory glutaminianergiczne (GluRs) odgrywają kluczową rolę w mechanizmach leżących u podstaw ważnych fizjologicznych funkcji mózgu, takich jak uczenie i pamięć [165]. Sądzi się również, że zaburzenia funkcji tych receptorów mogą być związane zarówno z ostrymi zaburzeniami neurologicznymi, takimi jak niedokrwienne uszkodzenie mózgu, jak i z chronicznymi schorzeniami neurodegeneracyjnymi, do których należy zaliczyć epilepsję, chorobę Parkinsona, Huntingtona i stwardnienie zanikowe boczne [16, 166]. Według najbardziej aktualnej klasyfikacji receptory glutaminianergiczne, ze względu na drogę, jaką przekazywany jest sygnał w układzie nerwowym, dzielą się na dwie klasy: jonotropowe i metabotropowe [167, 168]. Integralną częścią jonotropowych receptorów glutaminianergicznych są kationospecyficzne kanały jonowe. Aktywacja tych receptorów prowadzi do otwarcia kanałów jonowych, przez które odbywa się przepływ jonów zgodnie z gradientem stężenia. Farmakologiczny podział receptorów jonotropowych oparty jest na zróżnicowanej ich wrażliwości na egzogenne agonisty, kwas N-metylo-D-asparaginowy (NMDA). W klasie jonotropowych receptorów glutaminianergicznych wyróżnia się receptory NMDA wrażliwe na tego agonistę oraz receptory niewrażliwe na NMDA, czyli tak zwane receptory nie-NMDA, do których należy zaliczyć receptory AMPA pobudzane przez kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy (AMPA) i receptory kainowe (KA) pobudzane przez kwas kainowy. Receptory NMDA są przepuszczalne dla jonów Na^+ , Ca^{2+} i K^+ , natomiast AMPA i KA są przepuszczalne dla jonów Na^+ i K^+ , a znacznie słabiej dla jonów Ca^{2+} . Glutaminianergiczne receptory metabotropowe

są sprzężone z białkami G i funkcjonalnie są związane albo z obrotem fosforanu inozytoli, albo z metabolizmem cyklicznych nukleotydów [168]. W klasie receptorów metabotropowych wyróżnia się trzy grupy. Grupa I (mGluR1 i mGluR5) stymuluje powstanie 1,4,5-fosforanu inozytoli i diacyloglicerolu, natomiast grupy II (mGluR2 mGluR3) i III (mGluR4, mGluR6-8) redukują poziom wewnątrzkomórkowego c-AMP i c-GMP.

5.3.3. Budowa receptora NMDA

Receptor NMDA jest kompleksem białkowym, którego integralną część stanowi kanał jonowy przepuszczalny dla jonów Na^+ , Ca^{2+} i K^+ . Jak wskazują najnowsze badania, receptor ten jest zbudowany z 4, a nie, jak sądzono wcześniej, 5 podjednostek [169]. W jego skład wchodzić dwie podstawowe podjednostki NMDAR1 oraz dwie modulujące podjednostki NMDAR2, przy czym podjednostka NMDAR2 zależnie od kodującego ją genu jest zróżnicowana na 4 typy (NMDAR2A, NMDAR2B, NMDAR2C, NMDAR2D). W kompleksie receptora NMDA można wyróżnić kilka miejsc wiążących ligandy: (1) miejsce dla agonistów, takich jak glutaminian, asparaginian, NMDA, oraz antagonistów, takich jak AP-5 (kwas 2-amino-5-fosfonowalerianowy), CGS-19755 (kwas cis-4-fosfonometylo-2-piperidynokarboksylowy), CGP-37849 (kwas DL-(E)-2-amino-4-metylo-5-fosfono-3-walerianowy), AP-7 (kwas 2-amino-7-fosfonoheptanowy), CPP (kwas 3-(2-karboksypiperazyno-4-ilo)propylo-1-fosfonowy); (2) koagonistyczne miejsca wiążące glicynę i serynę; (3) miejsce wiążące Mg^{2+} wewnątrz kanału jonowego; (4) miejsce wiążące fencyklidynę (PCP) w kanale jonowym, do którego wiążą się także MK-801 i ketamina – związki o właściwościach antagonistycznych w stosunku do NMDA; (5) modulujące miejsce dla Zn^{2+} ; (6) miejsce poliaminowe oraz (7) miejsce wrażliwe na potencjał oksydoredukcyjny. Na ryc. 5 przedstawiony jest schemat budowy receptora NMDA.



Ryc. 5. Schemat receptora NMDA uwzględniający miejsca modulujące

5.3.4. Dlaczego glutation może być modulatorem neurotransmisji glutaminianergicznej?

W skład cząsteczki GSH wchodzi trzy aminokwasy będące powszechnie znanymi neuroprzekaznikami lub modulatorami transmisji glutaminianergicznej. **Glutaminian** jest agonistą wszystkich klas receptorów glutaminianergicznych, zarówno jonotropowych, jak i metabotropowych. Cząsteczka GSH mimo stosunkowo dużego rozmiaru i ograniczonej elastyczności, to jest właściwości, które mogą ograniczać jej zdolność do interakcji z receptorami lub białkami transporterowymi, wydaje się obiecującym ligandem dla miejsc wiążących glutaminian. Wolna **cysteina** jest neurotoksyną (p. rozdział 2), która może wywoływać nadaktywację receptorów NMDA w wieloraki sposób, między innymi poprzez redukcję funkcjonalnych grup hydrosulfidowych, tworzenie kompleksów z hamującymi jonami Zn^{2+} oraz poprzez podwyższenie poziomu kwasu cysteinosulfinowego, związku będącego agonistą receptora NMDA [170]. Cysteina jako składnik cząsteczki GSH jest całkowicie nietoksyczna, a co więcej GSH posiada właściwości neuroprotektcyjne. Mimo to GSH może nadal wpływać na stan redoks receptora NMDA przez wolną grupę hydrosulfidową. Z kolei **glicyna**, główny neuroprzekaznik hamujący w rdzeniu kręgowym, jest koagonistą w kompleksie receptora NMDA. Struktura chemiczna GSH wydaje się więc narzucać tej cząsteczce charakter związku neuroaktywnego, który może funkcjonować jako neuromodulator.

Modulowanie neurotransmisji glutaminianergicznej może odbywać się w następujący sposób:

1. Reszta glutamylowa cząsteczki GSH może działać jako agonista lub kompetycyjny antagonist receptorów glutaminianergicznych.

2. Reszta glicynowa może oddziaływać na koagonistyczne miejsce wiążące glicynę w kompleksie receptora NMDA.

3. Reszta cysteinowa może modulować wychwyt lub miejsca wiążące glutaminian na drodze bezpośredniej interakcji z funkcjonalnymi grupami tiolowymi białek transporterowych lub receptorowych. Ponadto reszta ta może regulować poziom związków redoksowych, takich jak tlenek azotu i askorbinian, czy też może tworzyć kompleksy z hamującymi jonami metali, takimi jak Zn^{2+} i Mg^{2+} [156].

Glutation może wchodzić w interakcję z neurotransmisją glutaminianergiczną na następujących jej etapach: (1) uwalniania pobudzających aminokwasów; (2) wychwytu pobudzających aminokwasów przez neurony i komórki glijowe; (3) wiązania glutaminianu i jego selektywnych analogów do różnych receptorów glutaminianergicznych; (4) generowania wtórnych przekazników oraz (5) uwalniania innych neuroprzekazników drogą aktywacji receptorów glutaminianergicznych.

5.3.5. Modulujący wpływ glutationu i jego pochodnych na wiązanie glutaminianu

Wpływ GSH i jego pochodnych na wiązanie znakowanego glutaminianu [3H]Glu badano *in vitro* w preparatach błon synaptycznych pochodzących z mózgu szczura [28, 156, 171]. Znakowany glutaminian wiąże się z błonami zarówno w obecności, jak i pod nieobecność jonów Na^+ . Zarówno GSH, jak i GSSG hamują sodowozależne wiązanie [3H]Glu z błonami synaptycznymi w temperaturze 2°C i 30°C. Podobny efekt

hamujący wywołują dipeptydy glutamylowe, np. γ -glutamyl-L-glutamina, γ -glutamyl-L-alanina, γ -glutamylotyrozyna, γ -glutamylhistydyna i inne zawierające w swojej cząsteczce glutaminian jako wolną resztę aminową. Takiego efektu nie wywołują natomiast związki, których grupa α -aminowa glutaminianu nie jest wolna, np. N-karbobenzoksylo-glutaminian czy kwas foliowy. Ponadto żaden ze związków zawierających wolną grupę hydrosulfidową, takich jak 2-merkaptotetanol, ditiotritol (DTT) lub ditioeritritol, nie hamuje sodowozależnego wiązania [^3H]Glu [156]. Badania te wyraźnie wskazują, że obecność wolnej grupy α -aminowej, a nie hydrosulfidowej ma decydujący wpływ na hamowanie sodowozależnego wiązania [^3H]Glu do błon synaptycznych przez te peptydy. Idąc tokiem tego rozumowania, również GSH i GSSG mogą wywoływać swoje efekty hamujące na wiązanie [^3H]Glu poprzez wolną resztę γ -glutamylową, a nie hydrosulfidową.

Wiele dowodów wskazuje, że zależne od Na^+ wiązanie [^3H]Glu odzwierciedla wysokie powinowactwo i sodowozależny transport glutaminianu przez błony synaptyczne [172]. Badania te nasunęły więc przypuszczenie, że obie formy glutationu (GSH i GSSG) mogą modulować transmisję glutaminianergiczną poprzez hamowanie sodowozależnego wychwytu glutaminianu ze szczeliny synaptycznej. Jednakże w warunkach fizjologicznych prawdopodobnie tylko glutation w formie zredukowanej wywiera taki efekt, gdyż stężenie GSSG jest bardzo niskie we wszystkich strukturach mózgu i wynosi mniej niż 1% całkowitej puli GSH. Ponadto, o czym była mowa wcześniej, endogenne GSH jest uwalniany w skrawkach mózgu pod wpływem depolaryzacji wywołanej jonami K^+ na drodze wapniowozależnej, głównie w formie zredukowanej [161]. Stąd też można sobie wyobrazić, że GSH pochodzący z kompartmentu neuronalnego może stymulować neurotransmisję glutaminianergiczną przez hamowanie wychwytu glutaminianu. Wychwyt neuroprzekaźników ze szczeliny synaptycznej uważany jest bowiem za mechanizm inaktywacyjny w mózgu ssaków. Brak jest jednak bezpośrednich dowodów potwierdzających hamujący wpływ GSH na wychwyt glutaminianu.

5.3.6. Modulujący wpływ glutationu na receptor NMDA

Aby ocenić domniemany udział GSH oraz innych związków tiolowych w procesie otwierania kanału jonowego receptora NMDA, badano ich wpływ na wiązanie znakowanych ligandów do różnych miejsc wiążących w obrębie kompleksu tego receptora. Doświadczenia wykonano na preparatach błon synaptycznych pochodzących z mózgu szczura [173, 174]. W stężeniach mikromolowych GSH, jak i GSSG hamują wiązanie znakowanych, kompetycyjnych antagonistów NMDA [^3H]CPP i [^3H]CGP 39653 do miejsc rozpoznających neuroprzekaźnik w kompleksie tego receptora [28, 156, 175]. Oprócz glutationu, tak w formie zredukowanej, jak i utlenionej, również jego S-alkylowe pochodne, takie jak np. S-metyloglutation, S-etyloglutation czy S-butyloglutation hamują wiązanie zarówno agonisty ([^3H]Glu), jak i antagonisty ([^3H]CPP) do miejsc rozpoznających neuroprzekaźnik [174]. Wyniki te nasunęły przypuszczenie, iż GSH i jego S-alkylowe pochodne wiążą się do tych miejsc w sposób niezależny od reszty hydrosulfidowej.

Wpływ GSH i jego pochodnych na miejsca wiążące fencyklidynę w kanale jonowym receptora NMDA badano przy użyciu [^3H]MK-801, niekompetycyjnego antago-

nisty, który uzyskuje dostęp do swojego miejsca wiązania dopiero przy otwartym kanale jonowym. GSH i jego pochodne w stężeniach niskich, poniżej 1 μM dawkozależnie potęgują [174], a w stężeniach wysokich obniżają wiązanie $[\text{H}^3]\text{MK-801}$ do błon synaptycznych [173, 174]. Efekt ten jest więc dwufazowy. Aktywujący wpływ obu form glutationu na wiązanie $[\text{H}^3]\text{MK-801}$ jest addytywny do efektu wywołanego przez glicynę. Antagoniści NMDA (CGP 39653, AP-5) oraz antagoniści miejsca glicynowego (kwas 7-chlorokinurenowy) zapobiegają aktywującemu działaniu GSH na wiązanie $[\text{H}^3]\text{MK-801}$, natomiast agoniści NMDA są pozbawieni tego działania. Ani GSH, ani jego pochodne nie potęgują wiązania $[\text{H}^3]\text{MK-801}$ w obecności glutaminianu. GSH wiąże się do miejsca w kanale jonowym receptora NMDA, podobnie jak do miejsca dla agonisty w tym receptorze poprzez wolną resztę γ -glutamylową [28, 176].

Zarówno GSH, jak i GSSG w stężeniach powyżej 100 μM wypierają w niewielkim stopniu znakowaną glicynę oraz kwas 5,7-dichlorokinurenowy (antagonista) z wiążących je miejsc w kompleksie receptora NMDA. Podobnie pochodne S-alkylowe GSH, lecz dopiero w wysokich stężeniach (1 mM), hamują wiązanie znakowanej glicyny do jej miejsca wiążącego [174]. Ponieważ powinowactwo koagonistycznego miejsca glicynowego do GSH i jego pochodnych jest słabo zaznaczone, przypuszcza się, że powyżej opisane efekty nie mają fizjologicznego znaczenia.

Nadal pozostaje przedmiotem dyskusji, czy wpływ glutationu (GSH i GSSG) na kompleks receptora NMDA ma charakter agonistyczny, czy też antagonistyczny [171, 177]. Z jednej strony nasilone pod wpływem GSH wiązanie MK-801 można interpretować jako potwierdzenie działania agonistycznego tego peptydu [157], gdyż podobny efekt wywołują również agoniści NMDA. Z drugiej strony, hamujący wpływ GSH w stężeniach mikromolowych (od 100 do 300 μM) na indukowany podaniem NMDA napływ jonów wapnia do komórek ziarnistych mózgu, wskazuje na rolę antagonistyczną tego peptydu [171]. Ponieważ wpływ na prądy wapniowe lepiej odzwierciedla biologiczną funkcję kompleksu receptora NMDA, a fizjologiczne stężenie zewnątrzkomórkowego GSH waha się w granicach wartości mikromolowych, Oja i współpracownicy [171] sugerują, że GSH jest antagonistą receptora NMDA. Koncepcja antagonistycznego działania GSH jest ponadto spójna z neuroprotektynym działaniem tego peptydu, zwłaszcza patrząc z punktu widzenia neurotoksyczności indukowanej przez NMDA [178].

Receptor NMDA jest wrażliwy na zmiany potencjału oksydoredukcyjnego środowiska. Właściwość ta jest związana z budową receptora NMDA, gdyż białka podjednostek tworzących kanał jonowy tego receptora zawierają w swoim składzie cysteinę, która może wchodzić w reakcje z reduktorami komórkowymi, takimi jak GSH czy kwas askorbinowy. Otwieranie kanału jonowego tego receptora jest podwyższone w warunkach redukcji, a zahamowane w warunkach utleniania. Modulacja funkcji receptora NMDA poprzez wpływ na jego stan redoks jest procesem kompleksowym, obejmującym co najmniej trzy miejsca zewnątrzkomórkowe [179]. Naturalny receptor NMDA oscyluje między stanem pełnej redukcji lub pełnego utlenienia. W warunkach eksperymentalnych disulfidowe substancje redukujące, np. ditiotreitól (DTT), potęgują, podczas gdy tiolowe związki utleniające, np. kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy (DTNB), hamują funkcje tego receptora. DTT nasila napływ jonów wapnia zainicjowany podaniem zarówno glutaminianu, jak i NMDA. Im wyższe stężenie glutaminianu, tym silniejszy wpływ DTT na napływ jonów wapnia [180]. Fakt ten wskazuje, że w aktywowanym kompleksie receptora NMDA miejscem działania DTT jest dostępne

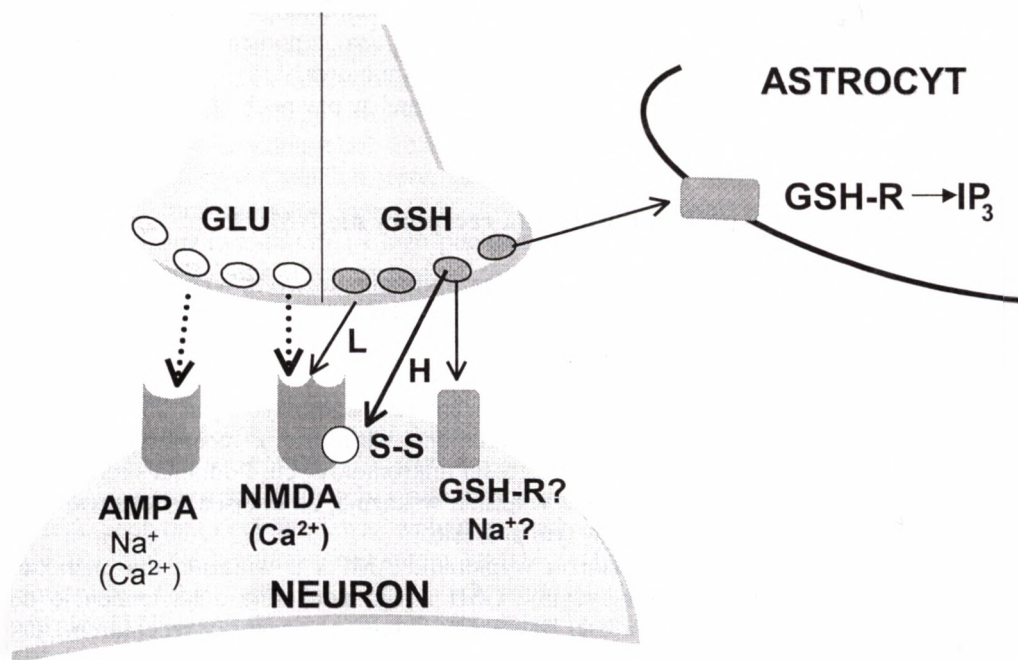
wiązanie disiarczkowe znajdujące się poza miejscem wiążącym glutaminian. Obie formy glutationu (GSH, GSSG) oraz ich pochodne nie wpływają na fizjologiczne prądy wapniowe w hodowanych komórkach ziarnistych mózdzku, hamują one natomiast napływ jonów wapnia indukowany glutaminianem lub innymi agonistami glutaminianergicznymi [171, 174]. GSH osłabia również napływ jonów wapnia indukowany przez DTT i glutaminian. Takiego efektu nie wywołuje jednak cysteina [177]. Mechanizm działania glutationu różni się więc od tego, jaki prezentuje DTT i cysteina. Jednakże w zakresie wysokich, milimolowych stężeń również GSH wywołuje aktywację receptora NMDA poprzez zmianę jego stanu redokсового [171]. W stężeniach tych GSH, podobnie jak DTT, potęguje odpowiedzi na glutaminian, szczególnie w komórkach, w których receptory NMDA zbudowane są z podjednostek NMDAR1 i NMDAR2A [181]. Modulacja ta nasila prądy wapniowe, których działanie może leżeć u podstaw zaburzonej aktywności synaptycznej w pewnych stanach patologicznych.

5.3.7. Modulujący wpływ glutationu na receptory nie-NMDA

Zarówno GSH, jak i GSSG, w zakresie stężeń fizjologicznych, wypierają w sposób zależny od wysokości dawek trytowane ligandy [^3H]AMPA i [^3H]KA związane ze specyficznymi receptorami w preparatach błon synaptycznych, wyizolowanych z mózgu szczura [174]. Obie formy glutationu wiążą się głównie do receptorów AMPA, natomiast ich powinowactwo do receptorów kainowych jest 25–30-krotnie niższe. Również S-alkylowe pochodne glutationu wiążą się z receptorami AMPA z powinowactwem w zakresie niskich wartości mikromolowych. Podobna skuteczność GSH i GSSG w wypieraniu AMPA z wiązania wskazuje, że miejsce redokсового tego receptora nie odgrywa istotnej roli w tym procesie.

Nie jest wiadomo, czy mechanizm wypierania AMPA z wiązania ma charakter kompetycyjny, czy też niekompetycyjny. GSH i jego pochodne mają tendencję do istotnego obniżania zarówno wartości B_{max} (gęstość miejsc wiązania z receptorem), jak i K_D (stała dysocjacji) receptora AMPA. Stąd też mechanizm hamowania wiązania AMPA przez GSH jest najwyraźniej bardziej złożony i może polegać na allosterycznej modulacji tego receptora. Glutation nie działa jako agonista receptora AMPA, gdyż depolaryzacja wywołana jego podaniem na skrawki korowe mózgu nie jest antagonizowana przez związek 6,7-dinitrochinoksalino-2-3-dion (DNQX), będący antagonistą receptorów nie-NMDA [158]. W świetle tych danych wydaje się, że GSH w stężeniach fizjologicznych wypiera glutaminian głównie z klasy receptorów AMPA w sposób allosteryczny przy udziale reszty γ -glutamylowej. Efekt ten może odgrywać pewną rolę w precyzyjnym regulowaniu neurotransmisji glutaminianergicznej poprzez skracanie czasu trwania prądów jonowych, w których powstaniu pośredniczy receptor AMPA. Receptory AMPA i NMDA są zlokalizowane w bezpośrednim sąsiedztwie w błonach postsynaptycznych i wzajemnie współdziałają. Receptor NMDA ulega aktywacji przez kwas glutaminowy dopiero przy odpowiednio intensywnej stymulacji receptorów AMPA i napływie do wnętrza neuronu pozytywnie naładowanych jonów Na^+ , co niweluje zależny od potencjału blok magnezowy [167]. Stąd też równoczesne uwalnianie glutaminianu i GSH z zakończeń nerwowych [35] może mieć głębokie konsekwencje dla transmisji synaptycznej. Na ryc. 6 przedstawiono hipotetyczny model działania GSH w synapsie zaproponowany przez Janáky i współpracowników [28].

zakończenie presynaptyczne



Ryc. 6. Hipotetyczny model synaptycznego działania GSH. W części presynaptycznej znajduje się glutaminian (GLU) i glutation (GSH). Zakończenie presynaptyczne jest podzielone, aby zaznaczyć, że GSH może znajdować się w tym samym zakończeniu co Glu lub w odrębnym. W części postsynaptycznej znajdują się receptory glutaminianergiczne (NMDA i AMPA), jak również receptory glutationowe (GSH-R). Strzałki wskazują kierunki działania uwalnianego Glu (linia przerywana) i GSH (linia ciągła). Glutaminian aktywuje receptory NMDA i AMPA. GSH działa bezpośrednio na własne receptory znajdujące się na neuronach i astrocytach, jak i na różne miejsca wiążące w kompleksie receptora NMDA, w tym także na miejsce wrażliwe na potencjał oksydoredukcyjny (S-S). Przedstawiony schemat wskazuje na zawartość interakcji pomiędzy neuroprzekaźnikami, gdy glutaminian i GSH są lokalnie uwalniane. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na złożoność tych procesów jest enzymatyczny rozpad GSH w synapsie do składowych aminokwasów (glutaminian, cysteina, glicyna), które indywidualnie mogą wpływać na funkcję receptorów glutaminianergicznych. L – niskie stężenie GSH, H – wysokie. IP_3 – trójfosforan inozytolu (wg Janáky i wsp. [30], zmodyfikowano)

GSH w stężeniach mikromolowych, po wywołaniu depolaryzacji przypuszczalnie drogą aktywacji własnych receptorów glutationowych (p. podrozdział 5.3.8), może hamować szybki potencjał depolaryzacyjny wywołany działaniem glutaminianu na receptory AMPA, blokując w sposób pośredni napięciowo zależne otwieranie kanału jonowego sąsiadującego receptora NMDA. Równoczesne uwalnianie glutaminianu i GSH zgodnie z hipotezą proponowaną przez Janáky i współpracowników [28] prowadziłoby zatem do kaskady zdarzeń, które umożliwiają receptorom harmonijną reaktywację w krótkim czasie.

5.3.8. Obecność i charakterystyka miejsc wiążących glutation

Badania receptorowe z użyciem trytowanego glutationu [H^3]GSH wykazały istnienie w układzie nerwowym miejsc o wysokim powinowactwie zarówno do glutationu, jak i jego pochodnych [27, 28, 177, 182, 183]. Miejsca te zostały zidentyfikowane po raz pierwszy w błonach synaptycznych pochodzących z mózgu szczura przez badaczy japońskich Ogite i Yonedę w 1987 roku. Od tego momentu coraz wyraźniej sugeruje się, że są one odrębnymi typami receptorów, do których GSH wiąże się resztą cysteiniową w stężeniach nano- do mikromolowych [28, 176]. Miejsca te są całkowicie odmienne od wszystkich znanych receptorów dla pobudzających aminokwasów, przy czym GSH nie jest z nich wypierany ani przez agonistów, ani antagonistów zarówno jonotropowych, jak i metabotropowych receptorów glutaminianergicznych. Glutation jest natomiast wypierany z tych miejsc w zakresie stężeń mikromolowych przez związki siarki, takie jak GSSG, S-nitrozoglutation, γ -glutamylcysteinę, cysteiloglicynę, cysteinę i nieco mniej efektywnie przez ditiotreitol, sulfonian glutationu oraz pochodne S-alkylowe glutationu [28, 177].

Podobnie jak receptor NMDA, miejsca wiążące GSH posiadają jedno lub więcej miejsc koagonistycznych do allosterycznej modulacji. Miejsca te wydają się sprzężone z kanałem sodowym, gdyż duży, szybki potencjał depolaryzacyjny wywołany podaniem GSH na skrawki korowe zanika, gdy w środowisku brakuje jonów sodu. Niedobór wapnia, jak również antagoniści receptorów NMDA i AMPA nie wpływają na wartość tego potencjału [158]. W układzie nerwowym obecność miejsc wiążących [H^3]GSH wykazano w następujących strukturach: siatkówka, podwzgórze, prążkowie, rdzeń kręgowy, śródmózgowie, most, hipokamp, mózdzek i kora mózgowa [158]. Część tych miejsc znajduje się na powierzchni astrocytów, oligodendrocytów oraz komórek mikrogleju. Podanie GSH do płynu hodowlanego, w którym znajdują się astrocyty wywołuje w tych komórkach wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia trifosforanu inozytolu. Fakt ten potwierdza istnienie w błonie komórkowej astrocytów receptorów dla GSH, jak również sugeruje, że są one sprzężone z fosfolipazą C [27, 182]. Ostateczne potwierdzenie istnienia receptora glutationowego będzie możliwe w momencie wyizolowania go i sklonowania.

5.3.9. Obecność i rola S-nitrozoglutationu (GSNO) w mózgu

Tlenek azotu odgrywa bardzo ważną rolę w wielu fizjologicznych procesach, w tym w regulacji ciśnienia krwi, w hamowaniu agregacji płytek krwi oraz w modulowaniu odporności i stanów zapalnych. W centralnym układzie nerwowym (CUN) NO działa

jako przekaźnik neuronalny, co ma duże znaczenie dla takich procesów, jak plastyczność neuronalna czy neurotoksyczność [184]. NO nie działa jak konwencjonalny neuroprzekaźnik, gdyż jako gaz łatwo dyfunduje przez błony komórkowe. Nie może być magazynowany w pęcherzykach synaptycznych ani też nie może być uwalniany na drodze egzocytozy. Chociaż pobudzenie receptora NMDA indukuje uwalnianie NO z komórek korowych, to, jak do tej pory, nie wiadomo, w jakiej formie redoksowej NO jest dostarczany, transportowany, a następnie przechowywany w centralnym systemie nerwowym. NO wykazuje bardzo silną reaktywność w stosunku do tioli komórkowych i tworzy z GSH S-nitrozoglutation (GSNO), a z cysteiną S-nitrozocysteinę. Fizjologiczne stężenie GSNO w mózdku wynosi 6 do 7 μM [185] i jest porównywalne ze stężeniem w surowicy krwi i w drogach oddechowych. Wartość stężenia GSNO w mózdku stanowi zaledwie znikomą część (od 0,3 do 0,6%) tkankowego stężenia GSH w mózgu (1 do 3 mM). Wartość ta jest natomiast zbliżona do zewnątrzkomórkowego stężenia tego peptydu w mózgu (p. podrozdział 5.2.2). Inkubacja skrawków mózgu z NMDA podnosi czterokrotnie poziom GSNO w tkance mózgowej.

Fizjologiczne znaczenie S-nitrozotiole w CUN nie jest znane. GSNO jest zarówno donorem NO, jak i najsilniejszym aktywatorem cykazy guanylowej [184]. Nie jest dotychczas wyjaśnione, czy endogenne GSNO *per se* aktywuje cyklazę guanylową, czy też aktywacja tego enzymu odbywa się poprzez uwolnienie z GSNO rodnika tlenu azotu. Obecność specyficznych miejsc wiążących dla znakowanego [^3H]GSNO [186] przemawia na korzyść pierwszej możliwości, co oznacza, że endogenne GSNO może wiązać się z błonami komórek docelowych i sam wywoływać aktywację. W odniesieniu do drugiej możliwości, GSNO może być bardziej stabilnym nośnikiem rodnika tlenu azotu, który swobodnie przechodzi przez błony komórkowe i działa aktywująco na cytozolową cyklazę guanylową w komórkach docelowych. GSNO może także brać udział w reakcjach S-nitrozylacji grup hydrosulfidowych białek o kluczowym znaczeniu dla komórki, takich jak ważne enzymy czy też receptory [187]. Ostatnio wykazano również, że GSNO ma bardzo silne właściwości antyoksydacyjne [188, 189] (p. rozdział 9).

5.4. Glutation a choroby neurologiczne

5.4.1. Schorzenia neurologiczne związane z glutationem

W piśmiennictwie ostatnich lat coraz więcej danych wskazuje na istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy schorzeniami neurologicznymi a zmianami w stężeniu GSH. U pacjentów z wrodzonym deficytem syntetazy glutationowej stwierdzono opóźnienie umysłowe, spastyczny paraliż kończyn i różne formy uszkodzeń mózgu. Z kolei u pacjentów z deficytem syntetazy γ -glutamylcysteinowej obserwowano uszkodzenia mózdkowo-rdzeniowe, brak odruchów kończyn dolnych oraz ataksję [30]. Badania *post mortem* prowadzone u ludzi ujawniają, że poziom GSH w substancji czarnej spada w przebiegu fizjologicznego procesu starzenia, jednak spadek ten jest najbardziej wyrazisty u pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona [3, 4, 190]. Najnowsze badania sugerują, że niedobór GSH lub zaburzenia jego metabolizmu mają również ścisły związek z takimi schorzeniami neurodegeneracyjnymi, jak stwardnienie zanikowe

boczne (ALS – *amyotrophic lateral sclerosis*) i choroba Alzheimera [16, 191]. Symptomy neuropsychiatryczne związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem receptorów glutaminianergicznym mogą mieć również coś wspólnego z neurologicznymi nieprawidłowościami wynikającymi ze zmian w poziomie GSH. Ostatnio wykazano, że zaburzenia w schizofrenii mogą być związane z niskim stężeniem GSH w korze przedczołowej [192].

Poziom GSH ulega drastycznemu obniżeniu podczas drgawek w eksperymentalnych modelach epilepsji [193] oraz u genetycznie zmodyfikowanych myszy epileptycznych [194]. Drgawki rozwijają się również jako następstwo niedoboru GSH u dorosłych szczurów, którym podawano BSO [195].

5.4.2. Rola glutationu w schizofrenii

Schizofrenia jest psychozą endogenną charakteryzującą się szeregiem symptomów, które klasycznie dzielone są na objawy pozytywne (wytwórcze), takie jak formalne zaburzenia myślenia, deluzje, halucynacje oraz negatywne (deficytowe) obejmujące zaburzenia funkcji kognitywnych, socjalnych, motywacyjnych oraz zaburzenia afektu. Schizofrenia jest chorobą o nieznanym patofizjologii i etiologii. Podłoże biologiczne tego schorzenia próbuje się wyjaśniać, opierając się na dwóch głównych hipotezach – dopaminowej i glutaminianergicznej, z których żadna przy obecnym stanie wiedzy nie pozwala w pełni na ustalenie przyczyn tej choroby. Dowody wskazujące na dysfunkcję systemu dopaminowego uwzględniają antypsychotyczne działanie antagonistów dopaminowych oraz indukujące psychozy działanie agonistów [196]. Hipoteza hipofunkcji glutaminianergicznej oparta jest na fakcie, że fencyklidyna (PCP) oraz inni niekompetyjni antagoniści receptora NMDA wywołują psychozy przypominające schizofrenię [197, 198].

Coraz więcej dowodów wskazuje, że w schizofrenii oprócz zmian w układach neurotransmisyjnych dochodzi również do zaburzeń w systemie antyoksydacyjnej obrony i do wzrostu uszkodzeń wywołanych toksycznym działaniem reaktywnych form tlenu [199]. U nieleczonych pacjentów z pierwszymi epizodami choroby opisano obniżoną aktywność jednego z głównych enzymów antyoksydacyjnych – dysmutazy ponadtlenkowej – w krwinkach czerwonych [200]. W innych badaniach prowadzonych w grupie pacjentów z pierwszymi objawami psychoz zaobserwowano podwyższony poziom nadtlenu lipidów oraz obniżoną aktywność peroksydazy glutationowej w osoczu [201]. Ostatnio Do i współpracownicy [192] stwierdzili metodami HPLC i spektrometrii masowej, że poziom GSH w płynie mózgowo-rdzeniowym u nieleczonych pacjentów z objawami schizofrenii jest o 27% niższy niż w grupie kontrolnej. U tych samych pacjentów równocześnie stwierdzono metodą jądrowego rezonansu magnetycznego 52% spadek poziomu GSH w korze prefrontalnej. W badaniach przeprowadzonych na innej grupie chorych na schizofrenię ci sami autorzy [202] wykazali również, że poziom dipeptydu γ -glutamylglutaminy (γ -Glu-Gln), który w większości powstaje z GSH przy udziale γ -GT, jest wyraźnie obniżony w płynie mózgowo-rdzeniowym w porównaniu z osobnikami kontrolnymi. Według Do i współpracowników [192], niedobór GSH może być przyczyną patofizjologicznych zmian w schizofrenii. Deficyt ten nie jest następstwem działania neuroleptyków, gdyż badania zostały wykonane u pacjentów, którym wcześniej nie podawano tych leków. Autorzy ci sądzą również, że

jest mało prawdopodobne, aby deficyt GSH był spowodowany niespecyficznymi zmianami neurodegeneracyjnymi, takimi jakie mają miejsce np. w chorobie Parkinsona lub Alzheimer'a. Wniosek ten wysuwają z faktu, że spadek w stężeniu GSH w płynie mózgowo-rdzeniowym i korze prefrontalnej nie ma związku ani z długością okresu trwania choroby, ani z wiekiem pacjentów. Deficyt ten mógłby być raczej związany z genetycznie uwarunkowanym brakiem enzymów biorących udział w metabolizmie GSH lub z osłabieniem ich funkcji. Faktycznie u chorych na schizofrenię stwierdzano obniżoną aktywność peroksydazy glutationowej w erytrocytach i płytkach krwi [203].

Powyżej opisane badania stanowią podwaliny nowej hipotezy, która usiłuje tłumaczyć zmiany obserwowane w schizofrenii mechanizmem glutationowym [185, 192]. Nadrzędnym celem tej hipotezy jest połączenie w jedną całość wielu biologicznych aspektów tej choroby. Zgodnie z założeniami tej hipotezy deficyt GSH w pewnych obszarach mózgu prowadzi do czterech istotnych następstw:

1. GSH dzięki obecności aktywnej grupy hydrosulfidowej bierze udział w redukowaniu wolnych rodników powstających między innymi podczas katabolizmu dopaminy [204]. Toksyczność dopaminy została udowodniona eksperymentalnie. Rabinovic i Hastings [205] wykazali, że doprądkowicie podanie dopaminy wywołuje wzrost ilości reaktywnych metabolitów, spadek poziomu endogennego GSH i degenerację zakończeń nerwowych zawierających hydroksylazę tyrozynową. Efekt ten był nasilany, gdy podaniu dopaminy towarzyszyło zahamowanie syntezy GSH, natomiast osłabiany, gdy równocześnie z dopaminą podawano GSH.

Liczne dowody wskazują, że w schizofrenii dochodzi do dysfunkcji kory przedczołowej. Dysfunkcja ta jest prawdopodobnie odpowiedzialna za upośledzone wykonanie przez chorych złożonych zadań psychologicznych, a w szczególności za nieprawidłowe funkcjonowanie procesów pamięci operacyjnej, co przez niektórych badaczy uważane jest za najistotniejszy defekt neuropsychologiczny w tej chorobie [206]. Nasilenie zaburzeń strukturalnych i czynnościowych kory przedczołowej wykazuje związek z objawami negatywnymi schizofrenii [207]. Według Goldman-Rakic i jej współpracowników [208, 209], którzy opisali wyspecjalizowaną, synaptyczną architektonikę kory przedczołowej, kolce dendrytyczne neuronów piramidowych są celem zarówno dla oddziaływań dopaminy, jak i glutaminianu. Ta synaptyczna organizacja jest niezwykle ważna dla przedstawionych poniżej rozważań.

Deficyt GSH obserwowany w korze przedczołowej u chorych na schizofrenię przyczynia się do osłabienia systemu antyoksydacyjnej obrony i sprzyja uszkodzającym działaniom wolnych rodników. Wydaje się, że toksyczne działanie metabolitów dopaminy może ograniczać się do mikrośrodowiska zakończeń dopaminowych unerwiających korę [206], prowadząc raczej do degeneracji kolców dendrytycznych i dendrytów niż samych neuronów. To założenie hipotezy glutationowej jest zgodne z pośmiertnie wykonaną analizą histologiczną kory przedczołowej schizofreników, która ujawniła zwiększoną gęstość neuronów, wskazującą na redukcję neuropilu [210]. W innych badaniach histologicznych faktycznie wykazano, że u chorych na schizofrenię w korach czołowej i skroniowej dochodzi do zmniejszenia się ilości kolców dendrytycznych na neuronach piramidowych [211, 212]. Poza tym indukowana deficytem GSH degeneracja kolców dendrytycznych może tłumaczyć obserwowany w schizofrenii spadek ilości receptorów dopaminowych D_1 [213], które między innymi są tam zlokalizowane.

Hipoteza ta również sugeruje, że niedobór GSH i/lub związanych z nim enzymów w czasie rozwoju zarodkowego mógłby stanowić poważny czynnik ryzyka w tej cho-

robie. Deficyt ten połączony z czynnikami środowiskowymi, takimi jak np. stres, który indukuje uwalnianie dopaminy, a co za tym idzie nasila produkcję wolnych rodników, mógłby prowadzić zarówno do degeneracji kolców dendrytycznych, jak i do zaburzeń cytoarchitektonicznych, czyli do powstania nieprawidłowych połączeń między neuronami. Gdyby założenie to okazało się słuszne, oznaczałoby, że deficyt GSH ma związek z zaburzeniami rozwoju mózgu. Zgodnie z neurorozwojową koncepcją schizofrenii, nieprawidłowości w łączności międzyneuronalnej mogą być odpowiedzialne za pewne symptomy tej choroby, takie jak zaburzenia funkcji kognitywnych i percepcyjnych [214].

2. GSH uwalniany do przestrzeni międzykomórkowych w korze [161] może funkcjonować, jak wskazują ostatnie badania, zarówno jako modulator receptorów glutaminianergicznych, jak i neuroprzekaznik działający przez własne receptory [18]. Może on potęgować odpowiedź receptorów NMDA na glutaminian, działając albo na modulujące miejsca redoksove [215] lub wiążące cynk (Zn^{+2}) w kanale receptora NMDA. Przy niskim poziomie GSH aktywacja receptorów NMDA może nie być dostateczna. Pewne symptomy schizofrenii można by wiązać z brakiem właściwej stymulacji receptorów NMDA, podobnie jak objawy psychotyczne wywoływane podaniem fencyklidyny lub antagonistów receptorów NMDA.

3. Spadek poziomu GSH w korze przedczołowej może również sprzyjać neurotoksycznemu działaniu NO, ponieważ rodnik ten nie będzie dostatecznie wychwytywany i magazynowany w formie S-nitrozoglutationu (GSNO) i w reakcji z anionorodnikiem ponadtlennokowym ulegać będzie przekształceniu w toksyczny jon nadtlenoazotynowy.

4. Obniżenie poziomu γ -glutamylglutaminy (γ -Glu-Gln) w płynie mózgowo-rdzeniowym można również wiązać z niedoborem GSH. Opisana ostatnio przez Dringena i współpracowników [135] interakcja metaboliczna między astrocytami a neuronami wskazuje, że astrocyty dostarczają neuronom Cys-Gly. Dipeptyd ten powstaje w przestrzeni międzykomórkowej z GSH przy udziale γ -GT i służy jako prekursor do syntezy GSH w neuronach. Równocześnie uwolniona podczas rozpadu GSH reszta γ -glutamylowa zostaje przeniesiona na glutaminę, do której γ -GT ma bardzo wysokie powinowactwo, i powstaje γ -Glu-Gln. Jednym z mechanizmów spadku poziomu GSH mógłby być wzrost aktywności γ -GT. Jednakże obserwowany spadek poziomu γ -Glu-Gln [202] przeczy temu przypuszczeniu.

Podsumowując, deficyt GSH i związanych z jego metabolizmem enzymów może odgrywać istotną rolę w patofizjologii schizofrenii i może stanowić poważny czynnik ryzyka w tym schorzeniu lub w pewnych jego formach.

5.4.3. Związek między niedoborem glutationu a procesem neurodegeneracyjnym

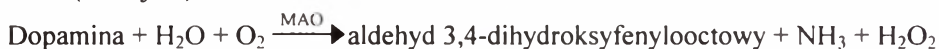
Aby udowodnić istnienie zależności między deficytem GSH a procesem neurodegeneracyjnym, przeprowadzono szereg eksperymentów na zwierzętach, u których środkami farmakologicznymi indukowano niedobór tego peptydu. W badaniach tych wykazano, że zarówno ostre [216, 217], jak i chroniczne [218], dokomorowe podania nieodwracalnego inhibitora syntetazy γ -glutamylcysteinowej – butioninosulfoksyminy (BSO) – obniżały, zależnie od stosowanych dawek, poziom GSH w prążkowi i substancji czarnej. Jednakże ilość komórek dopaminowych, barwiących się na obec-

ność hydroksylazy tyrozynowej, nie ulegała zmianom pod wpływem 28-dniowych dokomorowych podań tego inhibitora [218]. Wynik ten sugeruje, że sam niedobór GSH nie jest przyczyną uszkodzenia szlaku czarnoprążkowiowego w chorobie Parkinsona, może natomiast zwiększać wrażliwość neuronów dopaminowych na działanie endo- lub egzogennych toksyn. I tak wykazano, że BSO nasila neurodegeneracyjną aktywność znanych, modelowych toksyn o proparkinsonowskim profilu działania, takich jak: 1-metylo-4-fenylpirydyny (MPP⁺) [20] oraz 6-hydroksydopaminy [21] w substancji czarnej myszy. Z drugiej strony, w badaniach prowadzonych na myszach transgenicznym z zwiększoną ekspresją ludzkiego genu peroksydazy glutationowej (GPx), wykazano osłabienie neurotoksycznego działania 6-OHDA [219]. Dane te potwierdzają znaczącą rolę GSH i związanego z nim enzymu (GPx) w usuwaniu RFT. Badania histologiczne wykazały również, że deficyt GSH w komórkach jest przyczyną uszkodzeń mitochondriów [18, 25]. Z kolei wyniki badań na hodowlach neuronalnych sugerują, że niedobór GSH może być czynnikiem indukującym śmierć komórki na drodze apoptozy lub nekrozy [220].

Wszystkie powyżej wspomniane dane eksperymentalne sugerują istnienie związku przyczynowo-skutkowego między niedoborem GSH a procesem neurodegeneracyjnym. Nie są jednak znane zarówno czynniki odpowiedzialne za spadek poziomu GSH w chorobie Parkinsona, jak i mechanizmy prowadzące do śmierci komórek dopaminowych. Aktualne koncepcje patogenezy choroby Parkinsona wiązane są z produkcją wolnych rodników i stresem oksydacyjnym. Hipotetyczny mechanizm prowadzący do uszkodzenia neuronów dopaminowych w tej chorobie, uwzględniający oprócz wolnych rodników także udział GSH, zostanie przedstawiony w następnych podrozdziałach.

5.4.4. Stres oksydacyjny a choroba Parkinsona

Stres oksydacyjny łączony jest z patomechanizmem choroby Parkinsona ze względu na wyjątkowe właściwości neuronów dopaminowych substancji czarnej. Komórki te charakteryzują się wysokim stężeniem dopaminy i znaczną aktywnością monoamino-oksydazy (MAO). MAO katalizuje oksydacyjną deaminację dopaminy w ciałach neuronów dopaminowych substancji czarnej oraz w ich zakończeniach w prążkowie. W procesie tym powstaje aldehyd 3,4-dihydroksyfenylooctowy, amoniak i nadtlenek wodoru (reakcja 1).



Z reakcji tej wynika, że obrót dopaminy związany jest z generowaniem potencjalnej toksyny, czyli nadtlenu wodoru.

Dopamina może być również utleniana na drodze nieenzymatycznej reakcji, tzw. autooksydacji, w wyniku której powstają chinony, semichinony [11] oraz nadtlenek wodoru i rodniki tlenowe. Wszystkie produkty tej reakcji mogą być toksyczne dla komórki. Dlatego autooksydację uważa się za jeden z mechanizmów mogących prowadzić do degeneracji neuronów w chorobie Parkinsona. Ponadto komórki dopaminowe gromadzą niebezpieczne jony żelaza oraz zawierają neuromelaninę powstającą również w wyniku autooksydacji dopaminy i stanowiącą przypuszczalnie dodatkowe źródło wolnych rodników [15]. Wydaje się, że każdy z czynników, który prowadzi do zabu-

rzanej równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w komórkach, może sprzyjać procesowi neurodegeneracyjnemu, jaki zachodzi w przebiegu choroby Parkinsona.

5.4.5. Glutation w chorobie Parkinsona i jej zwierzęcych modelach

Obecnie proponowane są dwie hipotezy wyjaśniające mechanizm leżący u podstaw neurodegeneracji neuronów dopaminowych istoty czarnej w chorobie Parkinsona. Pierwsza z nich zakłada tworzenie się wysoce reaktywnych form tlenu, które mogą prowadzić do uszkodzeń neuronów w przypadku, gdy równowaga między procesami oksydacyjno-redukcyjnymi zostaje przesunięta w kierunku reakcji utleniania (tzw. zjawisko oksydacyjnego stresu) [221]. Druga z hipotez – nieco nowsza – przyjmuje, że mechanizmem prowadzącym do neurodegeneracji jest osłabienie aktywności mitochondrialnej, której konsekwencją jest zmniejszona produkcja energii i zmiany w metabolizmie neuronalnym [222]. W aspekcie obu tych hipotez można rozważać rolę GSH.

W chorobie Parkinsona jedną z bardziej charakterystycznych zmian biochemicznych, oprócz deficytu dopaminy, jest masowa utrata zredukowanego GSH w istocie czarnej [3, 4, 223]. Jak wykazano w porównawczych badaniach biochemicznych, prowadzonych pośmiertnie na mózgach pacjentów parkinsoników, zmiana w stężeniu GSH ograniczona jest tylko do tego rejonu mózgu i nie dotyczy innych struktur dopaminowych [4, 223, 224]. Nie stwierdzono natomiast spadku poziomu GSH w substancji czarnej w takich schorzeniach, jak: zanik wielosystemowy (ang. *multiply system atrophy* – MSA) i porażenie nadjądrowe (ang. *progressive supranuclear palsy* – PSP), w których podobnie jak w chorobie Parkinsona dochodzi do degeneracji neuronów dopaminowych [4, 224]. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że obniżenie stężenia GSH w substancji czarnej ma miejsce już we wczesnej fazie rozwoju choroby Parkinsona. Poziom GSH był obniżony w równym stopniu tak w presymptomatycznej chorobie Parkinsona z rozsianymi ciałkami Lewy’ego (ang. *presymptomatic Parkinson’s disease with incidental Lewy bodies*), jak i w zaawansowanym stadium tej choroby [224]. W cytowanych powyżej badaniach, z wyjątkiem wczesnej pracy Perriego i współpracowników [223], nie stwierdzono równoczesnego wzrostu poziomu disiarczku glutationu. W chorobie Parkinsona wykazano natomiast zwiększoną aktywność enzymu degradującego GSH, czyli γ -glutamylotranspeptydazy [225]. Chociaż fakty te zostały opisane przed wieloma laty, nadal niewiele jest wiadomo na temat przyczyn i mechanizmów prowadzących do niedoboru GSH w istocie czarnej w tym schorzeniu.

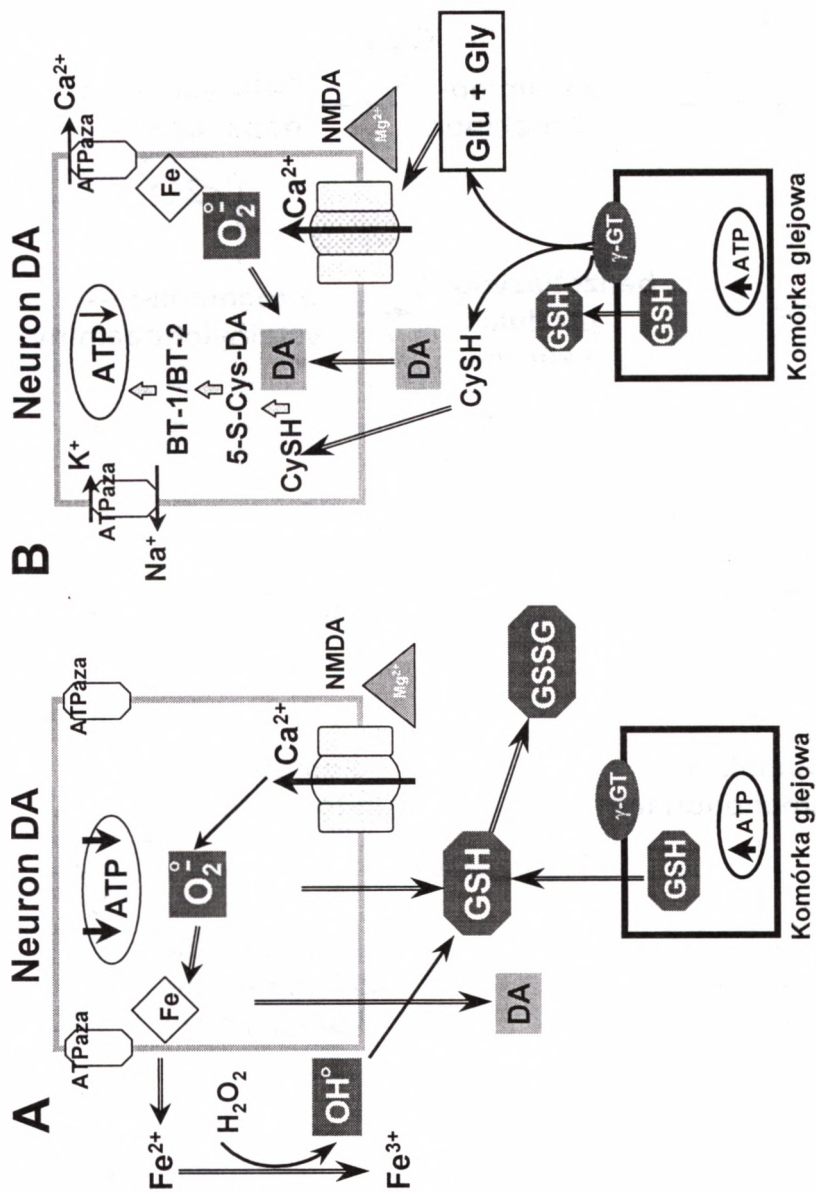
5.4.6. Związek między deficytem glutationu a toksycznością MPTP

Aby wyjaśnić, czy niedobór GSH ma związek z procesem neurodegeneracyjnym, analogicznym do tego, jaki ma miejsce w przebiegu choroby Parkinsona, podjęto badania nad wpływem MPTP (modelowa neurotoksyna o proparkinsonowskim profilu działania) na poziom GSH w strukturach dopaminowych mózgu. MPTP/MPP⁺ już w pojedynczych dawkach szybko i efektywnie obniża poziom GSH przy równoczesnym braku wzrostu GSSG [7, 226]. Wiadomo, że MPTP hamuje transport elektronów przez łańcuch oddechowy na poziomie reduktazy NADH-Q, zwanej także dehydrogenazą NADH lub kompleksem mitochondrialnym I [227]. Reakcja ta prowadzi do kry-

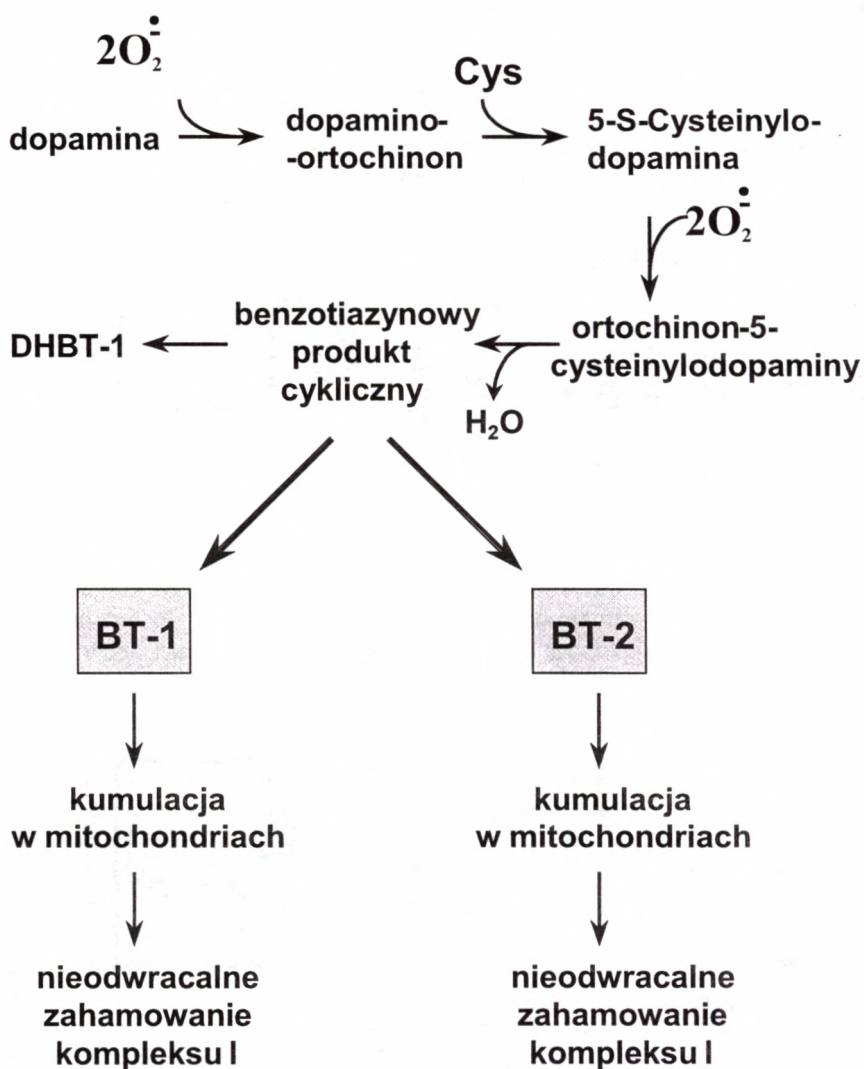
zysu energetycznego, którego skutkiem jest obniżenie syntezy ATP [228] i depolaryzacja błony cytoplazmatycznej [229]. Oba te procesy mogą wpływać na poziom GSH. Niedobór ATP z jednej strony może osłabiać syntezę GSH, gdyż reakcja ta wymaga nakładu energii, a z drugiej strony depolaryzacja błony może wywoływać wypływ GSH z komórki [161]. W badaniach prowadzonych przez Hana i współpracowników [230] z użyciem metody mikrodializy stwierdzono, że podczas perfuzji neurotoksycznych stężeń MPP⁺ do prążkowiec lub substancji czarnej zewnątrzkomórkowe stężenia GSH i cysteiny pozostawały na poziomie wyjściowym. Jednak w momencie zaprzestania perfuzji obserwowano przejściowy wysoki wzrost pozakomórkowego GSH i opóźniony w czasie wzrost poziomu cysteiny. Analogiczny efekt otrzymano podczas perfuzji do tych samych struktur jonu Fe²⁺. Wyniki te nasunęły przypuszczenie, że uwalnianie, a następnie degradacja GSH przy udziale enzymów γ -GT i dipeptydaz do glutaminianu, glicyny i cysteiny może stanowić ważny czynnik prowadzący do degeneracji neuronów dopaminowych w istocie czarnej. Skłoniło to autorów wspomnianej powyżej pracy do wysunięcia nowej hipotezy na temat mechanizmu neurotoksycznego działania MPTP. Hipotetyczny model toksyczności MPTP przedstawiono na ryc. 7.

Hipoteza ta oparta jest na licznych danych eksperymentalnych. Punktem wyjścia są badania, w których wykazano, że pod wpływem perfuzji MPP⁺ w neuronach dochodzi do bardzo silnego zahamowania syntezy ATP [228], jak i depolaryzacji błony komórkowej [229]. Skutkiem tych procesów jest masowe uwalnianie zarówno dopaminy [231], jak i GSH z komórek dopaminowych (ryc. 7A). Ponadto niedobór ATP przyczynia się również do usunięcia bloku magnezowego z receptora NMDA [232], umożliwiając w ten sposób jego aktywację przez zewnątrzkomórkowy glutaminian. Konsekwencją aktywacji receptora NMDA jest nadmierna produkcja anionorodnika ponadtlenkowego w neuronie [233]. Rodnik ten wchodząc w reakcje z kompleksami białkowymi, zawierającymi żelazo, przyczynia się do uwolnienia jonu Fe²⁺ [234, 235], który stanowi ważny czynnik w neurotoksyczności indukowanej przez MPTP [236, 237]. Kolejnym następstwem aktywacji receptora NMDA jest zwiększone stężenie anionorodnika ponadtlenkowego, także w przestrzeni pozakomórkowej [233], co sugeruje, że rodnik ten może przenikać przez błonę komórową. Uwolnione z kompleksu białkowego żelazo może brać udział w powstawaniu rodniaka hydroksylowego w przestrzeni pozakomórkowej [238] i, jak wykazują dane eksperymentalne, w rzeczywistości MPTP/MPP⁺ pośredniczy w jego tworzeniu się [239]. Rodnik hydroksylowy powstający podczas silnego niedoboru energetycznego jest utleniany nie tylko przez GSH uwalniany z neuronów dopaminowych, ale także przez GSH pochodzący z komórek glejowych. Wydaje się, że uwalnianie GSH z komórek glejowych może chronić komórki nerwowe przed toksycznością rodniaka hydroksylowego [163] (ryc. 7B).

W sytuacji, kiedy perfuzja MPTP do struktur dopaminowych mózgu zostanie przerwana, ustaje tworzenie się rodniaka hydroksylowego (ryc. 7B), jak również ustają procesy, w których on pośredniczy. Następuje wzrost syntezy ATP, powoli rozpoczyna się również wychwyt zwrotny dopaminy, która w reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym tworzy ortochinon dopaminowy [240]. Anionorodnik ponadtlenkowy reagując z dopaminą, przyczynia się do dalszego zahamowania uwalniania jonów żelaza z kompleksu białkowego. Po zaprzestaniu perfuzji MPP⁺ zachodzi nadal uwalnianie GSH, przypuszczalnie z komórek glejowych, i wydaje się, że reakcja ta ma służyć odnowieniu neuronalnej puli GSH [163]. Neurony nie mogą jednak bezpośrednio pobierać



Ryc. 7. Hipotetyczny mechanizm neurotoksycznego działania MPP⁺, uwzględniający przejściowy kryzys energetyczny i jego następstwa (wg Hana i wsp. [42], zmodyfikowano)



Ryc. 8. Proponowany mechanizm wewnątrzneuronalnej oksydacji dopaminy (DA) w obecności cysteiny (Cys), prowadzący do powstania endotoksyn, które nieodwracalnie hamują kompleks I mitochondrialny

zewnątrzkomórkowego GSH (p. podrozdział 5.2.5.4). Dlatego peptyd ten musi najpierw ulec enzymatycznej hydrolizie (γ -GT i dipeptydaza) do składowych aminokwasów, pobieranych następnie przez neurony i zużywanych do ponownej syntezy GSH. Niski, opóźniony w czasie wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia cysteiny, jak również masowe uwalnianie glicyny i glutaminy [241] wydają się potwierdzać istnienie tych reakcji. Po zaprzestaniu perfuzji MPP⁺, synteza ATP utrzymywana jest nadal na niskim poziomie, mimo iż pewne ostre efekty działania tej toksyny są w znacznym stopniu zniwelowane. Receptory NMDA pozbawione bloku magnezowego są nadal silnie aktywowane przez występujący w wysokim stężeniu glutaminian. Aktywacja ta prowadzi nadal do powstawania anionorodnika ponadtlenkowego, który przeprowadza dalszą oksydację dopaminy w neuronie. Wychwytowi zwrotnemu dopaminy towarzyszy napływ cysteiny do neuronu. Powstały w reakcji utleniania dopaminy ortochinon dopaminowy reaguje z cysteiną, tworząc 5-cysteinylodopaminę (5-S-Cys-DA) [240]. A zatem cysteina zamiast być wykorzystana do resyntezy GSH, zostaje zużyta przez ortochinon dopaminy, co staje się przyczyną nieodwracalnej utraty GSH w neuronach dopaminowych i co także potwierdza fakt braku wzrostu stężenia GSSG. 5-S-Cys-DA jest nadal utleniana przez anionorodnik ponadtlenkowy do ortochinonu 1 (ortochinon 5-cysteinylodopaminy), z którego w wyniku szybkiej przebudowy cząsteczki powstaje nowy produkt cykliczny, będący prekursorem zarówno dihydrobenzotiazyny (DHBT-1), jak i związków benzotiazynowych (BT-1, BT-2) [242]. Uproszczony przebieg tych reakcji przedstawiony jest na ryc. 8.

W badaniach *in vitro* wykazano, że benzotiazyny (BT-1, BT-2) mogą być gromadzone w mitochondriach [243], gdzie w sposób nieodwracalny hamują kompleks I mitochondrialny [244]. Trwałe zahamowanie tego kompleksu jest czynnikiem decydującym o degeneracji neuronów dopaminowych w substancji czarnej.

Literatura

- [1] Halliwell B. (1992), *Reactive oxygen species and the central nervous system*. J. Neurochem., 59, 1609–1623.
- [2] Simonian N.A., Coyle J.T. (1996), *Oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 36, 83–106.
- [3] Sofic E., Lange K.W., Jellinger K., Riederer P. (1992), *Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease*. Neurosci. Lett., 142, 128–130.
- [4] Sian J., Dexter D.T., Lees A.J., Daniel S., Agid Y., Javoy-Agid F., Jenner P., Marsden C.D. (1994), *Alterations of glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia*. Ann. Neurol., 36, 348–355.
- [5] Kish S.J., Morito C., Hornykiewicz O. (1985), *Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease*. Neurosci. Lett., 58, 343–346.
- [6] Ambani L.M., Van Worth M.H., Murthy S. (1975), *Brain peroxidase and catalase in Parkinson's disease*. Arch. Neurol., 32, 114–118.
- [7] Sriram K., Pai K.S., Boyd M.R., Ravindranath V. (1997), *Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies with mice*. Brain Res., 749, 44–52.
- [8] Halliwell B., Aruoma O.J. (1991), *DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems*. FEBS Lett., 281, 9–19.

- [9] Oliver C.N., Starke-Reed P.E., Stadtman E.R., Liu G.J., Carney J.M., Floyd R.A. (1990), Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5144–5147.
- [10] Dexter D.T., Carter C.J., Wells F.R., Javoy-Agid F., Agid Y., Lee A., Jenner P., Marsden D. (1989), *Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease*. *J. Neurochem.*, 52, 381–389.
- [11] Graham D.G. (1978), *Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones*. *Mol. Pharmacol.*, 14, 633–643.
- [12] Clarke D.D., Sokoloff L. (1999), *Circulation and energy metabolism of the brain*. W: *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*. Eds. Sigel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S.K., Uhler M.D., Lippincott-Raven, Philadelphia, 637–669.
- [13] Evans P.H. (1993), *Free radicals in brain metabolism and pathology*. *Br. Med. Bull.*, 49, 577–587.
- [14] Porter N.A. (1984), *Chemistry of lipid peroxidation*. *Meth. Enzymol.*, 105, 273–282.
- [15] Fahn S., Cohen G. (1992), *The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: Evidence supporting it*. *Ann. Neurol.*, 32, 804–812.
- [16] Bains J.S., Shaw C.A. (1997), *Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death*. *Brain Res., Rev.* 25, 335–358.
- [17] Di Monte D.A., Chan P., Sandy M.S. (1992), *Glutathione in Parkinson's disease: A link between oxidative stress and mitochondrial damage?* *Ann. Neurol.*, 32, S111–S115.
- [18] Jain A., Mårtensson J., Stole E., Auld P.A.M., Meister A. (1991), *Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1913–1917.
- [19] Mizui T., Kinouchi H., Chan P.H. (1992), *Depletion of brain glutathione by buthionine sulfoximine enhances cerebral ischemic injury in rats*. *Am. J. Physiol.*, 262, H313–H317.
- [20] Wüllner U., Löschmann P.A., Schulz J.B., Schmid A., Dringen R., Eblen F., Turski L., Klockgether T. (1996), *Glutathione depletion potentiates MPTP and MPP⁺ toxicity in nigral dopaminergic neurons*. *NeuroReport*, 7, 921–923.
- [21] Pileblad E., Magnusson T., Fornstedt B. (1989), *Reduction of brain glutathione by L-buthionine sulfoximine potentiates the dopamine-depleting action of 6-hydroxydopamine in rat striatum*. *J. Neurochem.*, 52, 978–980.
- [22] Cotgreave I.A., Gerdes R.G. (1998), *Recent trends in glutathione biochemistry – glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation?* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 242, 1–9.
- [23] Poot M., Teubert H., Rabinovitch P.S., Kavanagh T.J. (1995), *De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle*. *J. Cell Physiol.*, 163, 555–560.
- [24] Ghibelli L., Fanelli C., Rotilio G., Lafavia E., Coppola S., Colussi C., Civitareale P., Ciriolo M.R. (1998), *Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion*. *FASEB J.*, 12, 479–486.
- [25] Hall A.G. (1999), *The role of glutathione in the regulation of apoptosis*. *Eur. J. Clin. Invest.*, 29, 238–245.
- [26] Cooper A.J.L., Kristal B.S. (1997), *Multiple roles of glutathione in the central nervous system*. *Biol. Chem.*, 378, 793–802.
- [27] Guo N., McIntosh C., Shaw C. (1992), *Glutathione: New candidate neuropeptide in the central nervous system*. *Neuroscience*, 51, 835–842.
- [28] Janáky R., Ogita K., Pasqualotto B.A., Bains J.S., Oja S.S., Yoneda Y., Shaw C.A. (1999), *Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS*. *J. Neurochem.*, 73, 889–902.
- [29] Slivka A., Spina M.B., Cohen G. (1987), *Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain*. *Neurosci. Lett.*, 74, 112–118.

- [30] Orlowski M., Karkowsky A. (1976), *Glutathione metabolism and some possible functions of glutathione in the nervous system*. Int. Rev. Neurobiol., 19, 75–121.
- [31] Anderson M.E., Underwood M., Bridges R.J., Meister A. (1989), *Glutathione metabolism at the blood-cerebrospinal fluid barrier*. FASEB J., 3, 2527–2531.
- [32] Baronti F., Davis T.L., Boldry R.C., Mouradian M.M., Chase T.N. (1992), *Deprenyl effects on levodopa pharmacodynamics, mood, and free radical scavenging*. Neurology, 42, 541–544.
- [33] Slivka A., Mytilineou C., Cohen G. (1987), *Histochemical evaluation of glutathione in brain*. Brain Res., 409, 275–284.
- [34] Philbert M.A., Beiswanger C.M., Waters D.K., Reuhl K.R., Lowndes H.E. (1991), *Cellular and regional distribution of reduced glutathione in the nervous system of the rat: histochemical localization by mercury orange and o-phthalaldehyde-induced histofluorescence*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 107, 215–227.
- [35] Hjelle O.P., Rinvik E., Huster D., Reichelt W., Ottersen O.P. (1998), *Antibodies to glutathione: production, characterization and immunocytochemical application to the central nervous system*. W: *Glutathion in the nervous system*. Eds. Shaw C.A., Taylor and Francis, Washington, 63–88.
- [36] Reed D.J., Babson J.R., Beatty P.W., Brodie A.E., Ellis W.W., Potter D.W. (1980), *High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides*. Anal. Bioch., 106, 55–62.
- [37] Dringen R., Hamprecht B. (1996), *Glutathione content as an indicator for the presence of metabolic pathways of amino acids in astroglial cultures*. J. Neurochem., 67, 1375–1382.
- [38] Raps S.P., Lai J.C.K., Hertz L., Cooper A.J.L. (1989), *Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons*. Brain Res., 493, 398–401.
- [39] Sagara J., Miura K., Bannai S. (1993), *Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and suspension*. J. Neurochem., 61, 1667–1671.
- [40] Pileblad E., Eriksson P.S., Hansson E. (1991), *The presence of glutathione in primary neuronal and astroglial cultures from rat cerebral cortex and brain stem*. J. Neural. Transm., [GenSect], 86, 43–49.
- [41] Langeveld C.H., Schepens E., Jongenelen C.A.M., Stoof J.C., Hjelle O.P., Ottersen O.P., Drukarch B. (1996), *Presence of glutathione immunoreactivity in cultured neurons and astrocytes*. NeuroReport, 7, 1833–1836.
- [42] Reed D.J. (1990), *Glutathione: toxicological implications*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 30, 300–305.
- [43] Panfili E., Sandri G., Ernster L. (1991), *Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria*. FEBS Lett., 290, 35–37.
- [44] Griffith O.W., Meister A. (1985), *Origin and turnover of mitochondrial glutathione*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4668–4672.
- [45] Mårtensson J., Lai J.C.K., Meister A. (1990), *High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 7185–7189.
- [46] Wüllner U., Seyfried J., Groscurth P., Beinroth S., Winter S., Gleichmann M., Heneka M., Löschnann P.A., Schulz J.B., Weller M., Klockgether T. (1999), *Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediate and mitochondrial function*. Brain Res., 826, 53–62.
- [47] Petronilli V., Costantini P., Scorrano L., Colonna R., Passamonti S., Bernardi P. (1994), *The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols: increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents*. J. Biol. Chem., 269, 16638–16642.
- [48] Gunter T.E., Pfeiffer D.R. (1990), *Mechanisms by which mitochondria transport calcium*. Am. J. Physiol., 258, C755–C786.

- [49] Barker J.E., Bolanos J.P., Land J.M., Clark J.B., Heales S.J.R. (1996), *Glutathione protects astrocytes from peroxynitrite-mediated mitochondrial damage: implications for neuronal/astrocytic trafficking and neurodegeneration*. Dev. Neurosci., 18, 391–396.
- [50] Koppenol W.H., Moreno J.J., Pryor W.A., Ischiropoulos H., Beckman J.S. (1992), *Peroxy-nitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide*. Chem. Res. Toxicol., 5, 834–842.
- [51] Mizuno Y., Yoshida H., Ikebe S., Hattori N., Kobayashi T., Shimoda-Matsubayashi S., Matsumine H., Kondo T. (1998), *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. Ann. Neurol., 44 (Suppl. 1), S99–S109.
- [52] Schapira A.H.V. (1999), *Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease*. Parkinsonism and Related Disorders, 5, 139–143.
- [53] Benuck M., Banay-Schwartz M., DeGuzman T., Lajtha A. (1995), *Effect of food deprivation on glutathione and amino acid levels in brain and liver of young and aged rats*. Brain Res., 678, 259–264.
- [54] Wade L.A., Brady H.M. (1981), *Cysteine and cystine transport at the blood-brain barrier*. J. Neurochem., 37, 730–734.
- [55] Ennis S.R., Kawai N., Ren X.D., Abdelkarim G.E., Keep R.F. (1998), *Glutamine uptake at the blood-brain barrier is mediated by N-system transport*. J. Neurochem., 71, 2565–2573.
- [56] Kannan R., Kuhlenkamp J.F., Ookhtens M., Kaplowitz N. (1992), *Transport of glutathione at blood-brain barrier of the rat: inhibition by glutathione analogs and age-dependence*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 263, 964–970.
- [57] Zlokovic B.V., Mackic J.B., McComb J.G., Weiss M.H., Kaplowitz N., Kannan R. (1994), *Evidence for transcapillary transport of reduced glutathione in vascular perfused guinea-pig brain*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 201, 402–408.
- [58] Mischeck U., Meyer J., Galla J., Galla H.J. (1989), *Characterization of γ -glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries*. Cell Tissue Res., 256, 221–226.
- [59] Roux F., Durieu-Trautmann O., Chaverot N., Claire M., Mailly P., Bourre J.M., Strosberg A.D., Courad P.O. (1994), *Regulation of γ -glutamyl transpeptidase and alkaline phosphate activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells*. J. Cell. Physiol., 159, 101–113.
- [60] Kannan R., Yi J.R., Tang D.R., Li Y., Zlokovic B.V., Kaplowitz N. (1998), *Carrier-mediated GSH transport at the blood-brain barrier and molecular characterization of novel brain GSH transporters*. W: *Glutathione in the nervous system*. Ed. Shaw C.A., Taylor and Francis, Washington, 45–62.
- [61] Kannan R., Mittur A., Bao Y., Tsuruo T., Kaplowitz N. (1999), *GSH transport in immortalized mouse brain endothelial cells: evidence for apical localization of a sodium-dependent GSH transporter*. J. Neurochem., 73, 390–399.
- [62] Kannan R., Chakrabarti R., Tang D., Kim K.J., Kaplowitz N. (2000), *GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes: evidence for luminal localization of Na⁺ – dependent GSH transport in HCEC*. Brain Res., 852, 374–382.
- [63] Sagara J., Makino N., Bannai S. (1996), *Glutathione efflux from cultured astrocytes*. J. Neurochem., 66, 1876–1881.
- [64] Yudkoff M., Pleasure D., Cregar L., Lin Z.P., Nissim I., Stern J., Nissim I. (1990), *Glutathione turnover in cultured astrocytes: studies with [¹⁵N] glutamate*. J. Neurochem., 55, 137–145.
- [65] Clancy R.M., Levartovsky D., Leszczyńska-Piziak J., Yegudin J., Abramson S.B. (1994), *Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediate*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3680–3684.

- [66] Winterbourn C.C., Metodieva D. (1994), *The reactions of superoxide with reduced glutathione*. Arch. Biochem. Biophys., 314, 284–290.
- [67] Singh S.P., Wishnok J.S., Keshive M., Deen W.M., Tannenbaum S.R. (1996), *The chemistry of the S-nitroso-glutathione/glutathione system*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 14428–14433.
- [68] Ben-Yoseph O., Boxer P.A., Ross B.D. (1994), *Oxidative stress in central nervous system: monitoring the metabolic response using the pentose phosphate pathway*. Dev. Neurosci., 16, 328–336.
- [69] Ben-Yoseph O., Boxer P.A., Ross B.D. (1996), *Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress*. J. Neurochem., 66, 2329–2337.
- [70] Dringen R., Hamprecht B. (1997), *Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells*. Brain Res., 759, 67–75.
- [71] Dringen R., Kussmaul L., Hamprecht B. (1998), *Rapid clearance of tertiary butyl hydroperoxide by cultured astroglial cells via oxidation of glutathione*. Glia, 23, 139–145.
- [72] Kussmaul L., Hamprecht B., Dringen R. (1999), *The detoxification of cumene hydroperoxide by the glutathione system of cultured astroglial cells hinges on hexose availability for the regeneration of NADPH*. J. Neurochem., 73, 1246–1253.
- [73] Desagher S., Glowinski J., Premont J. (1996), *Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity*. J. Neurosci., 16, 2553–2562.
- [74] Dringen R., Kussmaul L., Hamprecht B. (1998), *Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by a microtiter plate assay*. Brain Res. Protoc., 2, 223–238.
- [75] Dringen R., Hamprecht B., Drukarch B. (1998), *Anethole dithiolethione, a putative neuro-protectant, increases intracellular and extracellular glutathione levels during starvation of cultured astroglial cells*. Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol., 358, 616–622.
- [76] Langeveld C.H., Jongenelen C.A.M., Schepens E., Stoof J.C., Bast A., Drukarch B. (1995), *Cultured rat striatal and cortical astrocytes protect mesencephalic dopaminergic neurons against hydrogen peroxide toxicity independent of their effect on neuronal development*. Neurosci. Lett., 192, 13–16.
- [77] Chen Y., Vartiainen N.E., Ying W., Chan P.H., Koistinaho J., Swanson R.A. (2001), *Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism*. J. Neurochem., 77, 1601–1610.
- [78] Drukarch B., Schepens E., Stoof J.C., Langeveld C.H., Van Muiswinkel F.L. (1998), *Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species*. Free Radic. Biol. Med., 25, 217–220.
- [79] Tanaka J., Toku K., Zhang B., Ishihara K., Sakanaka M., Maeda N. (1999), *Astrocytes prevent neuronal death induced by reactive oxygen and nitrogen species*. Glia, 28, 85–96.
- [80] Drukarch B., Schepens E., Jongenelen C.A.M., Stoof J.C., Langeveld C.H. (1997), *Astrocyte-mediated enhancement of neural survival is abolished by glutathione deficiency*. Brain Res., 770, 123–130.
- [81] Dringen R., Gutterer J.M., Hirrlinger J. (2000), *Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species*. Eur. J. Biochem., 267, 4912–4916.
- [82] Ursini F., Maiorino M., Brigelius-Flohe' R., Aumann K.D., Roveri A., Schomburg D., Flohe' L. (1995), *Diversity of glutathione peroxidases*. Meth. Enzymol., 252, 38–35.
- [83] Vernet P., Rigaudiere N., Ghyselinck N., Dufaure J.P., Drevet J.R. (1996), *In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage*. Biochem. Cell Biol., 74, 125–131.

- [84] Ho Y.S., Magnenat J.L., Bronson R.T., Cao J., Gargano M., Sugawara M., Funk C.D. (1997), *Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia*. J. Biol. Chem., 272, 16664–16651.
- [85] Ushijima K., Miyazaki H., Morioka T. (1986), *Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in the brain of the rat*. Resuscitation, 13, 97–105.
- [86] Lindenau J., Noack H., Asayama K., Wolf G. (1998), *Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration*. Glia, 24, 252–256.
- [87] Trepanier G., Furling D., Puymirat J., Mirault M.E. (1996), *Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain*. Neuroscience, 75, 231–243.
- [88] Takizawa S., Matsushima K., Shinohara Y., Ogawa S., Komatsu N., Utsunomiya H., Watanabe K. (1994), *Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in infarcted human brain*. J. Neurosci. Sci., 122, 66–73.
- [89] Damier P., Hirsch E.C., Zhang P., Agid Y., Javoy-Agid F. (1993), *Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease*. Neuroscience, 52, 1–6.
- [90] Lopez-Barea J., Barcena J.A., Bocanegra J.A., Florindo J., Garcia-Alfonso C., Lopez-Ruiz A., Martinez-Galisteo E., Peinado J. (1990), *Structure, mechanism, functions, and regulatory properties of glutathione reductase*. W: *Glutathione: Metabolism and physiological functions*. Ed. Vina J., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 105–116.
- [91] Gutterer J.M., Dringen R., Hirrlinger J., Hamprecht B. (1999), *Purification of glutathione reductase from bovine brain, generation of an antiserum and immunocytochemical localization of the enzyme in neural cells*. J. Neurochem., 73, 1422–1430.
- [92] Knollemma S., Hom H.V., Schirmer H., Korf J., Ter Horst G.J. (1996), *Immunolocalization of glutathione reductase in the murine brain*. J. Comp. Neurol., 373, 157–172.
- [93] Salinas A.E., Wong M.G. (1999), *Glutathione S-transferases – a review*. Curr. Med. Chem., 6, 279–309.
- [94] Awasthi Y.C., Sharma R., Singhal S.S. (1994), *Human glutathione S-transferases*. Int. J. Biochem., 26, 295–308.
- [95] Johnson J.A., Barbary A.E., Kornguth S.E., Brugge J.F., Siegel F.L. (1993), *Glutathione S-transferase isoenzymes in rat brain neurons and glia*. J. Neurosci., 13, 2013–2023.
- [96] Philbert M.A., Beiswanger C.M., Manson M.M., Green J.A., Novak R.F., Primiano T., Reuhl K.R., Lowndes H.E. (1995), *Glutathione-S-transferases and γ -glutamyl transpeptidase in the rat nervous system: a basis for differential susceptibility to neurotoxicants*. Neurotoxicology, 16, 349–362.
- [97] Tansey F.A., Cammer W. (1991), *A Pi form of glutathione-S-transferase is a myelin- and oligodendrocyte-associated enzyme in mouse brain*. J. Neurochem., 57, 95–102.
- [98] Dringen R. (2000), *Metabolism and functions of glutathione in brain*. Progr. Neurobiol., 62, 649–671.
- [99] Richman P.G., Meister A. (1975), *Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione*. J. Biol. Chem., 250, 1422–1426.
- [100] Sekura R., Meister A. (1977), *γ -glutamylcysteine synthetase: further purification, 'half of the sites' reactivity, subunits, and specificity*. J. Biol. Chem., 252, 2599–2605.
- [101] Oppenheimer L., Wellner V.P., Griffith O.W., Meister A. (1979), *Glutathione synthetase: purification from rat kidney and mapping of substrate binding sites*. J. Biol. Chem., 254, 5184–5190.
- [102] Tate S.S., Ross L.L., Meister A. (1973), *The γ -glutamyl cycle in the choroid plexus: its possible function in amino acid transport*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1447–1449.
- [103] Okonkwo P.O., Orlowski M., Green J.P. (1974), *Enzymes of the γ -glutamyl cycle in the choroid plexus and brain*. J. Neurochem., 22, 1053–1058.
- [104] Makar T.K., Nedergaard M., Preuss A., Gelbard A.S., Perumal A.S., Cooper A.J.L. (1994), *Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabo-*

lism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. J. Neurochem., 62, 45–53.

- [105] Wallin C., Weber S.G., Sandberg M. (1999), *Glutathione efflux induced by NMDA and kainate: implications in neurotoxicity?* J. Neurochem., 73, 1566–1572.
- [106] Reichelt K.L. (1970), *The isolation of gamma-glutamyl peptides from monkey brain.* J. Neurochem., 17, 19–25.
- [107] Sandberg M., Li X., Folestad S., Weber S.G., Orwar O. (1994), *Liquid chromatographic determination of acidic β -aspartyl and γ -glutamyl peptides in extracts of rat brain.* Anal. Biochem., 217, 48–61.
- [108] Reyes E., Barela T.D. (1980), *Isolation and purification of multiple forms of γ -glutamyl transpeptidase from rat brain.* Neurochem. Res., 5, 159–170.
- [109] Frey A., Meckelein B., Weiler-Güttler H., Möckel B., Flach R., Gassen H.G. (1991), *Pericytes of the brain microvasculature express γ -glutamyl transpeptidase.* Eur. J. Biochem., 202, 421–429.
- [110] Zhang H.F., Ong W.Y., Leong S.K., Laperche Y. (1997), *Species differences in the localization of gamma-glutamyl transpeptidase immunopositive cells at the blood-brain interface.* Brain Res., 38, 323–330.
- [111] Orlowski M., Sessa G., Green J.P. (1974), *γ -glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a blood-brain barrier for amino acids.* Science, 184, 66–68.
- [112] Thompson G.A., Meister A. (1975), *Utilization of L-cystine by the γ -glutamyl transpeptidase – γ -glutamyl cyclotransferase pathway.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1985–1988.
- [113] Wolff J.E.A., Munstermann G., Grebenkämper K., Erben M. (1998), *Gamma-glutamyl transpeptidase does not act as a cystine transporter in brain microvessels.* Neurochem. Res., 23, 1175–1178.
- [114] Vina J.R., Palacin M., Puertes I.R., Hernandez R., Vina J. (1989), *Role of γ -glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation.* Am. J. Physiol., 257, E916–E922.
- [115] Lee W.J., Hawkins R.A., Peterson D.R., Vina J.R. (1996), *Role of oxoproline in the regulation of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier.* J. Biol. Chem., 271, 19129–19133.
- [116] Jäger M., Weber P., Wolf S. (1999), *Immunohistochemical localization of 5-oxo-L-prolinase, an enzyme of the γ -glutamyl cycle, in porcine brain microvessels.* FEBS Lett., 445, 215–217.
- [117] Dringen R., Hamprecht B. (1998), *Glutathione restoration as indicator for cellular metabolism of astroglial cells.* Dev. Neurosci., 20, 401–407.
- [118] Kranich O., Dringen R., Sandberg M., Hamprecht B. (1998), *Utilization of cysteine and cysteine precursors for the synthesis of glutathione in astroglial cultures: preference for cystine.* Glia, 22, 11–18.
- [119] Kranich O., Hamprecht B., Dringen R. (1996), *Different preferences in the utilization of amino acids for glutathione synthesis in cultured neurons and astroglial cells derived from rat brain.* Neurosci. Lett., 219, 211–214.
- [120] Dringen R., Verleysdonk S., Hamprecht B., Willker W., Leibfritz D., Brand A. (1998), *Metabolism of glycine in primary astroglial cells: synthesis of creatine, serine, and glutathione.* J. Neurochem., 70, 835–840.
- [121] Dringen R., Kranich O., Löschmann P.A., Hamprecht B. (1997), *Use of dipeptides for the synthesis of glutathione by astroglia-rich primary cultures.* J. Neurochem., 69, 868–874.
- [122] Dringen R., Hamprecht B., Bröer S. (1998), *The peptide transporter PepT2 mediates the uptake of the glutathione precursor CysGly in astroglia-rich primary cultures.* J. Neurochem., 71, 388–393.
- [123] Juurlink B.H.J., Thorburne S.K., Hertz L. (1998), *Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocyte susceptibility to oxidative stress.* Glia, 22, 371–378.

- [124] Huang J., Philbert M.A. (1996), *Celular responses of cultured cerebellar astrocytes to ethacrynic acid-induced perturbation of subcellular glutathione homeostasis*. Brain Res., 711, 184–192.
- [125] Montoliu C., Sancho-Tello M., Azorin I., Bursal M., Vallés S., Renau-Piqueras J., Guerri C. (1995), *Ethanol increases cytochrome P450E1 and induces oxidative stress in astrocytes*. J. Neurochem., 65, 2561–2570.
- [126] Juurlink B.H.J., Schültke E., Hertz L. (1996), *Glutathione release and catabolism during energy substrate restriction in astrocytes*. Brain Res., 710, 229–233.
- [127] Garcia-Nogales P., Almeida A., Fernandez E., Medina J.M., Bolanos J.P. (1999), *Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide mediated glutathione depletion in cultured rat astrocytes*. J. Neurochem., 72, 1750–1758.
- [128] Han S.K., Mytilineou C., Cohen G. (1996), *L-DOPA up-regulates glutathione and protects mesencephalic cultures against oxidative stress*. J. Neurochem., 66, 501–510.
- [129] Aschner M., Mullaney K.J., Wagoner D., Lash L.H., Kimmelberg H.K. (1994), *Intracellular glutathione (GSH), levels modulate mercuric chloride (MC) and methylmercuric chloride (MeHgCl)-induced amino acid release from neonatal rat primary astrocytes cultures*. Brain Res., 664, 133–140.
- [130] Garcion E., Sindji L., Leblondel G., Brachet P., Darcy F. (1999), *1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates γ -glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes*. J. Neurochem., 73, 859–866.
- [131] Dringen R., Kussmaul L., Gutterer J.M., Hirrlinger J., Hamprecht B. (1999), *The glutathione system of peroxidase detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells*. J. Neurochem., 72, 2523–2530.
- [132] Müller W.E.G., Romero F.J., Perovic S., Pergande G., Pialoglou P. (1997), *Protection of flupirtine on β -amyloid-induced apoptosis in neuronal cells in vitro: prevention of amyloid-induced glutathione depletion*. J. Neurochem., 68, 2371–2377.
- [133] Almeida A., Heales S.J.R., Bolanos J.P., Medina J.M. (1998), *Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion*. Brain Res., 790, 209–216.
- [134] Sagara Y. (1998), *Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol*. J. Neurochem., 71, 1002–1012.
- [135] Dringen R., Pfeiffer B., Hamprecht B. (1999), *Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione*. J. Neurosci., 19(1), 562–569.
- [136] Sagara J., Miura K., Bannai S. (1993), *Maintenance of neuronal glutathione by glial cells*. J. Neurochem., 61, 1672–1676.
- [137] Dringen R., Hamprecht B. (1999), *N-Acetylcysteine, but not methionine or 2-oxothiazolidine-4-carboxylate, serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain*. Neurosci. Lett., 259, 79–82.
- [138] Thornburne S.K., Juurlink B.H.J. (1996), *Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress*. J. Neurochem., 67, 1014–1022.
- [139] Kim J.S., Kim S.U. (1991), *Oligodendroglia, cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase*. J. Neurosci. Res., 29, 100–106.
- [140] Back S.A., Gan X., Li Y., Rosenberg P.A., Volpe J.J. (1998), *Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion*. J. Neurosci., 18, 6241–6253.
- [141] Yonezawa M., Back S.A., Gan X., Rosenberg P.A., Volpe J.J. (1996), *Cystine deprivation induces oligodendroglial death: rescue by free radical scavenger and by a diffusible glial factor*. J. Neurochem., 67, 566–573.

- [142] Rosenberg P.A., Li Y., Ali S., Altiock N., Back S.A., Volpe J.J. (1999), *Intracellular redox state determines whether nitric oxide is toxic or protective to rat oligodendrocytes in culture*. J. Neurochem., 73, 476–484.
- [143] Richter-Landsberg C., Vollgraf U. (1998), *Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglial cells*. Exp. Cell Res., 244, 218–229.
- [144] Chatterjee S., Noack H., Possel H., Keilhoff G., Wolf G. (1999), *Glutathione levels in primary glial cultures: monochlorobimane provides evidence of cell type specific distribution*. Glia, 27, 152–161.
- [145] Hirrlinger J., Gutterer J.M., Kussmaul L., Hamprecht B., Dringen R. (2000), *Microglial cells in culture express a prominent glutathione system for the defense against reactive oxygen species*. Dev. Neurosci., 22, 384–392.
- [146] Sankarapandi S., Zweier J.L., Mukherjee G., Quinn M.T., Haso D.L. (1998), *Measurement and characterization of superoxide generation in microglial cells: evidence for an NADPH oxidase-dependent pathway*. Arch. Biochem. Biophys., 353, 312–321.
- [147] Minghetti L., Levi G. (1998), *Microglia, as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide*. Prog. Neurobiol., 54, 99–125.
- [148] Arteel G.E., Briviba K., Sies H. (1999), *Protection against peroxynitrite*. FEBS Lett., 445, 226–230.
- [149] Bolanos J.P., Heales S.J.R., Peuchen S., Barker J.E., Land J.M., Clark J.B. (1996), *Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione*. Free Radic. Biol. Med., 21, 995–1001.
- [150] Hertz L., Dringen R., Schousboe A., Robinson S.R. (1999), *Astrocytes: glutamate producers for neurons*. J. Neurosci. Res., 57, 417–428.
- [151] Taniguchi N., Ikeda Y. (1998), *γ -glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression*. Adv. Enzymol., 72, 239–278.
- [152] Garcion E., Do Thanh X., Bled F., Teissier E., Dehouck M.P., Rigault F., Brachet P., Girault A., Torpier G., Darcy F. (1996), *1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates γ -glutamyl transpeptidase activity in rat brain*. Neurosci. Lett., 216, 183–186.
- [153] Yang C.S., Chou S.T., Lin N.N., Liu L., Tsai P.J., Kuo J.S., Lai J.S. (1994), *Determination of extracellular glutathione in rat brain by microdialysis and high-performance liquid chromatography with fluorescent detection*. J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., 661, 231–235.
- [154] Lada M.W., Kennedy R.T. (1997), *In vivo monitoring of glutathione and cysteine in rat caudate nucleus using microdialysis on-line with capillary zone electrophoresis-laser induced fluorescence detection*. J. Neurosci. Meth., 72, 153–159.
- [155] Orwar Ö., Li X., Andine P., Bergström C.M., Hagberg H., Folestad S., Sandberg M. (1994), *Increased intra- and extra-cellular concentration of γ -glutamylglutamate and related dipeptides in the ischemic rat striatum: involvement of γ -glutamyl transpeptidase*. J. Neurochem., 63, 1371–1376.
- [156] Janáky R., Varga V., Jenei Z., Saransaari P., Oja S.S. (1998), *Glutathione and glutathione derivatives: Possible modulators of ionotropic glutamate receptors*. W: *Glutathione in the nervous system*. Ed. Shaw C.A., Taylor and Francis, Washington, 163–196.
- [157] Ogita K., Shuto M., Maeda H., Minami T., Yoneda Y. (1998), *Possible modulation by glutathione of glutamatergic neurotransmission*. W: *Glutathione in the nervous system*. Ed. Shaw C.A., Taylor and Francis, Washington, 137–161.
- [158] Pasqualotto B.A., Curry K., Shaw C.A. (1998), *Excitatory actions of GSH on neocortex*. W: *Glutathione in the nervous system*. Ed. Shaw C.A., Taylor and Francis, Washington, 197–227.
- [159] Reichelt K.L., Fonnum F. (1969), *Subcellular localization of N-acetyl-aspartyl-glutamate, N-acetyl-glutamate and glutathione in brain*. J. Neurochem., 16, 1409–1416.
- [160] Keller H.J., Do K.Q., Zollinger M., Winterhalter K.H., Cuénod M. (1989), *Cysteine: Depolarization-induced release from rat brain in vitro*. J. Neurochem., 52, 1801–1806.

- [161] Zängerle G.D., Cuenod M., Winterhalter K.H., Do K.Q. (1992), *Screening of thiol compounds: depolarization-induced release of glutathione and cysteine from rat brain slices*. J. Neurochem., 59, 181–189.
- [162] Andiné P., Orwar O., Jacobson I., Sandberg M., Hagberg H. (1991), *Extracellular acidic sulfur-containing amino acids and γ -glutamyl peptides in global ischemia: postischemic recovery of neuronal activity is paralleled by a tetrodotoxin-sensitive increase in cysteine sulfinate in the CA1 of the rat hippocampus*. J. Neurochem., 57, 472–478.
- [163] Dringen R., Kranich O., Hamprecht B. (1997), *The γ -glutamyl transpeptidase inhibitor acivicin preserves glutathione released by astroglial cells in culture*. Neurochem., Res. 22, 727–733.
- [164] Aw T.Y., Ookhtens M., Ren C., Kaplowitz N. (1986), *Kinetics of glutathione efflux from isolated hepatocytes*. Am. J. Physiol., 250, G236–G243.
- [165] Collingridge G.L., Singer W. (1990), *Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity*. Trends Pharmacol. Sci., 11, 290–296.
- [166] Lipton S.A., Rosenberg P.A. (1994), *Mechanisms of disease: excitatory amino acids as final common pathway for neurologic disorders*. N. Engl. J. Med., 330, 613–622.
- [167] Seeburg P.H. (1993), *The TINS/TIPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels*. Trends Neurosci., 16, 359–365.
- [168] Nakanishi S., Mosu M. (1994), *Molecular diversity and functions of glutamate receptors*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 23, 319–348.
- [169] Laube B., Kuhse J., Betz H. (1998), *Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors*. J. Neurosci., 18, 2954–2961.
- [170] Olney J.W., Zorumski C., Price M.T., Labruyere J. (1990), *L-cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin*. Science, 248, 569.
- [171] Oja S.S., Janáky R., Varga V., Saransaari P. (2000), *Modulation of glutamate receptor functions by glutathione*. Neurochem. Int., 37, 299–306.
- [172] Vincent S.R., McGeer E.G. (1980), *A comparison of sodium-dependent glutamate binding with high-affinity glutamate uptake in rat striatum*. Brain Res., 184, 99–108.
- [173] Varga V., Jenei Z., Janáky R., Saransaari P., Oja S.S. (1997), *Glutathione is an endogenous ligand of rat brain N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-izoxazolepropionate (AMPA) receptors*. Neurochem. Res., 22, 1165–1171.
- [174] Jenei Z., Janáky R., Varga V., Saransaari P., Oja S.S. (1998), *Interference of S-alkyl derivatives of glutathione with brain ionotropic glutamate receptors*. Neurochem. Res., 23, 1087–1093.
- [175] Yoneda Y., Ogita K., Kouda T., Ogawa Y. (1990), *Radioligand labeling of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors by [3 H](\pm 3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-l-phosphonic acid in brain synaptic membranes treated with Triton X-100*. Biochem. Pharmacol., 39, 225–228.
- [176] Oja S.S., Janáky R., Saransaari P., Jenei Z., Varga V. (1995), *Interaction of glutathione derivatives with brain 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-izoxazolepropionate (AMPA) receptors*. Proc. West. Pharmacol. Soc., 38, 9–11.
- [177] Janáky R., Shaw C.A., Varga V., Hermann A., Dohovics R., Saransaari P., Oja S.S. (2000), *Specific glutathione binding sites in pig cerebral cortical synaptic membranes*. Neuroscience, 96, 617–624.
- [178] Levy D.I., Sucher N.J., Lipton S.A. (1991), *Glutathione prevents N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity*. Neuroreport, 2, 345–347.
- [179] Gozlan H., Ben-Ari Y. (1995), *NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection?* TiPS, 16, 368–374.
- [180] Janáky R., Varga V., Saransaari P., Oja S.S. (1993), *Glutathione modulates the N-methyl-D-aspartate receptor-activated calcium influx into cultured rat cerebellar granule cells*. Neurosci. Lett., 156, 153–157.

- [181] Köhr G., Eckardt S., Lüddens H., Monyer H., Seeburg P.H. (1994), *NMDA receptor channels: subunit-specific potentiation by reducing agents*. *Neuron*, 12, 1031–1040.
- [182] Guo N., Shaw C. (1992), *Characterization and localization of glutathione binding sites on cultured astrocytes*. *Mol. Brain Res.*, 15, 207–215.
- [183] Lanius R.A., Shaw C.A., Wagey R., Krieger C. (1994), *Characterization, distribution, and protein kinase C-mediated regulation of [³⁵S]-glutathione binding sites in mouse and human spinal cord*. *J. Neurochem.*, 63, 155–160.
- [184] Garthwaite J., Boulton C.L. (1995), *Nitric oxide signaling in the central nervous system*. *Annu. Rev. Physiol.*, 57, 683–706.
- [185] Cuénod M., Do K.Q. (1998), *Glutathione release and nitrosogluthathione presence in CNS: implications for schizophrenia*. W: *Glutathione in the nervous system*. Ed. Shaw C.A., 275–285.
- [186] Taguchi I., Ohta H., Talman W.T. (1995), *Identification and pharmacological characterization of an S-nitrosogluthathione binding site in rat brain*. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 21, 626.
- [187] Meffert M.K., Calakos N.C., Scheller R.H., Schulman H. (1996), *Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking/fusion reactions*. *Neuron*, 16, 1229–1236.
- [188] Rauhala P., Mohanakumar P., Sziraki I., Lin A.M., Chiueh C.C. (1996), *S-nitrosothiols and nitric oxide, but not sodium nitroprusside, protect nigrostriatal dopamine neurons against iron-induced oxidative stress in vivo*. *Synapse*, 23, 58–60.
- [189] Rauhala P., Lin A.M., Chiueh C.C. (1998), *Neuroprotection by S-nitrosogluthathione of brain dopamine neurons from oxidative stress*. *FASEB. J.*, 12, 165–173.
- [190] Dexter D.T., Sian J., Rose H., Hindmarsh J.G., Mann V.M., Cooper J.M., Wells F.R., Daniel S.E., Lee A.J., Schapira A.H.V., Jenner P., Marsden C.D. (1994), *Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease*. *Ann. Neurol.*, 35, 38–44.
- [191] Benzi G., Moretti A. (1995), *Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system*. *Free Radic. Biol. Med.*, 19, 77–101.
- [192] Do K.Q., Trabesinger A.H., Kristen-Krüger M., Lauer C.J., Dydak U., Hell D., Holsboer F., Boesinger P., Cuénod M. (2000), *Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo*. *Eur. J. Neurosci.*, 12, 3721–3728.
- [193] Hiramatsu M., Mori A. (1981), *Reduced and oxidized glutathione in brain and convulsions*. *Neurochem. Res.*, 6, 301–306.
- [194] Abbott L.C., Nejad H.H., Bottje W.G., Hassan A.S. (1990), *Glutathione levels in specific brain regions of genetically epileptic (tg/tg) mice*. *Brain Res. Bull.*, 25, 629–631.
- [195] Hu H.L., Bennett N., Holton J.L., Nolan C.C., Lister T., Roy D.E. (1996), *Increased susceptibility of brain to m-dinitrobenzene neurotoxicity by glutathione depletion*. *Hum. Exp. Toxicol.*, 15, 145–155.
- [196] Davis K.L., Kahn R.S., Ko G., Davidson M. (1991), *Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization*. *Am. J. Psychiatry*, 148, 1474–1486.
- [197] Javitt D.C., Zukin S.R. (1991), *Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia*. *Am. J. Psychiatry*, 148, 1301–1308.
- [198] Olney J.W., Farber N.B. (1995), *Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia*. *Arch. Gen. Psychiatry*, 47, 1023–1028.
- [199] Mahadik S.P., Mukherjee S. (1996), *Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia a review*. *Schizophr. Res.*, 19, 1–17.
- [200] Mukherjee S., Mahadik S.P., Scheffer R., Correnti E.E., Kelkar H. (1996), *Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis*. *Schizophr. Res.*, 19, 19–26.
- [201] Mahadik S.P., Mukherjee S., Scheffer R., Correnti E.E., Mahadik J.S. (1998), *Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis*. *Biol. Psychiatry*, 43, 674–679.

- [202] Do K.Q., Lauer C.J., Schreiber W., Zollinger M., Gutteck-Amsler U., Cuénod M., Holsboer F. (1995), *Gamma-glutamylglutamine and taurine concentrations are decreased in the cerebrospinal fluid of drug-naïve patients with schizophrenic disorders*. J. Neurochem., 65, 2652–2662.
- [203] Buckman T.D., Kling A.S., Eiduson S., Sutphin M.S., Steinberg A. (1987), *Glutathione peroxidase and CT scan abnormalities in schizophrenia*. Biol. Psychiatry, 22, 1349–1356.
- [204] Spina M.B., Cohen G. (1989), *Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1398–1400.
- [205] Rabinowic A.D., Hastings T.G. (1998), *Role of endogenous glutathione in the oxidation of dopamine*. J. Neurochem., 71, 2071–2078.
- [206] Goldman-Rakic P.S. (1994), *Working memory dysfunction in schizophrenia*. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci., 6, 348–357.
- [207] Berman K.F., Weinberger D.R. (1990), *The prefrontal cortex in schizophrenia and other neuro-psychiatric diseases: In vivo physiological correlates of cognitive deficits*. Prog. Brain Res., 85, 521–537.
- [208] Goldman-Rakic P.S., Leranth C., Williams S.M., Mons N., Geffard M. (1989), *Dopamine synaptic complex with pyramidal neurons in primate cerebral cortex*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9015–9019.
- [209] Krimer L.S., Jakab R.L., Goldman-Rakic P.S. (1997), *Quantitative three-dimensional analysis of the catecholaminergic innervation of identified neurons in the macaque prefrontal cortex*. J. Neurosci., 17, 7450–7461.
- [210] Selemon L.D., Rajkowska G., Goldman-Rakic P.S. (1998), *Elevated neuronal density in prefrontal area 46 in brains from schizophrenic patients: application of a three-dimensional, stereologic counting method*. J. Comp. Neurol., 392, 402–412.
- [211] Garey L.J., Ong W.Y., Patel T.S., Kanani A., Mortimer A.M., Barnes T.R.E., Hirsch S.R. (1998), *Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 65, 446–453.
- [212] Harrison P.J. (1999), *The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation*. Brain, 122, 593–624.
- [213] Okubo Y., Suhara T., Suzuki K., Kobayashi K., Inoue O., Terasaki O., Someya Y., Sassa T., Sudo Y., Matsushima E., Iyo M., Tateno Y., Toru M. (1997), *Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by pet*. Nature, 385, 634–636.
- [214] Parnas J., Bovet P., Innocenti G.M. (1996), *Schizophrenic trait features, binding, and cortico-cortical connectivity: a neurodevelopmental pathogenetic hypothesis*. Neurology Psychiatry Brain Res., 4, 185–196.
- [215] Sullivan J.M., Traynelis S.F., Chen H.S., Escobar W., Heinemann S.F., Lipton S.A. (1994), *Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor*. Neuron, 13, 929–936.
- [216] Pileblad E., Magnusson T. (1992), *Increase in rat brain glutathione following intracerebroventricular administration of γ -glutamylcysteine*. Bioch. Pharmacol., 44, 895–903.
- [217] Seaton T.A., Jenner P., Marsden C.D. (1996), *Thioctic acid does not restore glutathione levels or protect against the potentiation of 6-hydroxydopamine toxicity induced by glutathione depletion in rat brain*. J. Neuronal. Transm., 103, 315–239.
- [218] Toffä S., Kunikowska G.M., Zeng B.Y., Jenner P., Marsden C.D. (1997), *Glutathione depletion in rat brain does not cause nigrostriatal pathway degeneration*. J. Neural. Transm., 104, 67–75.
- [219] Bensadoun C., Mirochnitchenko O., Inouye M., Aebischer P., Zurn A.D. (1998), *Attenuation of 6-OHDA-induced neurotoxicity in glutathione peroxidase transgenic mice*. Eur. J. Neurosci., 10, 3231–3236.
- [220] Ratan R.R., Murphy T.H., Baraban J.M. (1994), *Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons*. J. Neurochem., 62, 376–379.

- [221] Olanow C.W. (1990), *Oxidation reactions in Parkinson's disease*. Neurology, 40 (suppl. 3), 32–37.
- [222] Di Monte D.A. (1991), *Mitochondrial DNA and Parkinson's disease*. Neurology, 41 (suppl. 2), 38–42.
- [223] Perry T.L., Yong V.W. (1986), *Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients*. Neurosci. Lett., 67, 269–274.
- [224] Jenner P., Dexter D.T., Sian J., Schapira A.H.V., Marsden C.D. (1992), *Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease*. Ann. Neurol., 32, S82–S87.
- [225] Sian J., Dexter D.T., Lees A.J., Daniel S., Jenner P., Marsden C.D. (1994), *Glutathione related enzymes in Parkinson's disease*. Ann. Neurol., 36, 356–361.
- [226] Ferraro T.N., Golden G.T., DeMattei M., Hare T.A., Fariello R.G. (1986), *Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on level of glutathione in the extrapyramidal system of the mouse*. Neuropharmacology, 25, 1071–1074.
- [227] Ramsay R.R., Dadgar J., Trevor A., Singer T.P. (1986), *Energy driven uptake of N-methyl-4-phenylpyridine by brain mitochondria mediates the neurotoxicity*. Life Sci., 39, 581–588.
- [228] Chan P., Delanney L.E., Irwin I., Langston J.W., Di Monte D. (1991), *Rapid ATP loss caused by MPTP in mouse brain*. J. Neurochem., 57, 348–351.
- [229] Chiueh C.C., Huang S.J. (1991), *MPP⁺ enhances potassium evoked striatal release through a Ω -conotoxin-insensitive, tetrodotoxin- and nimodipine-sensitive calcium dependent mechanism*. Ann. NY Acad. Sci., 635, 393–396.
- [230] Han J., Cheng F.C., Yang Z., Dryhurst G. (1999), *Inhibitors of mitochondrial respiration, iron (II), and hydroxyl radical evoke release and extracellular hydrolysis of glutathione in rat striatum and substantia nigra: potential implications to Parkinson's disease*. J. Neurochem., 73, 1683–1695.
- [231] Rollema H., Damsma G., Horn A.S., De Vries J.B., Westerink B.H.C. (1986), *Brain dialysis in conscious rats reveals an instantaneous massive release of striatal dopamine in response to MPP⁺*. Eur. J. Pharmacol., 126, 345–346.
- [232] Zeevalk G.D., Nicklas W.J. (1991), *Mechanisms underlying initiation of excitotoxicity associated with metabolic inhibition*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 257, 870–878.
- [233] Lafon-Cazal M., Pletti S., Culcasi M., Bockaert J. (1993), *NMDA receptor-dependent superoxide production and neurotoxicity*. Nature, 364, 535–537.
- [234] Brieland J.K., Fantone J.C. (1991), *Ferrous iron release from transferrin by human neurotrophil-derived superoxide anion: effect of pH and iron saturation*. Arch. Biochem. Biophys., 284, 78–83.
- [235] Yoshida T., Tanaka M., Somomatsu A., Hirai S. (1995), *Activated microglia, cause superoxide-mediated release of iron from ferritin*. Neurosci. Lett., 63, 56–60.
- [236] Lan J., Jiang D.H. (1997), *Desferrioxamine and vitamin E protect against iron and MPTP-induced neurodegeneration in mice*. J. Neural. Transm., 104, 469–481.
- [237] Santiago M., Matarredona E., Granero L., Cano J., Machado A. (1997), *Neuroprotective effects of the iron chelator desferrioxamine against MPP⁺ toxicity on striatal dopaminergic terminals*. J. Neurochem., 68, 732–738.
- [238] Gutteridge J.M.C. (1996), *Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration*. Ann. NY Acad. Sci., 738, 201–213.
- [239] Chiueh C.C., Wu R.M., Mohanakumar K.P., Sternberger L.M., Krishna G., Obata T., Murphy D.L. (1994), *In vivo generation of hydroxyl radicals and MPTP-induced dopaminergic toxicity in the basal ganglia*. Ann. NY Acad. Sci., 738, 25–36.
- [240] Spencer J.P.E., Jenner P., Daniel S.E., Lees A.J., Marsden C.D., Halliwell B. (1998), *Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: Possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species*. J. Neurochem., 71, 2112–2122.

- [241] Carboni S., Melis F., Pani L., Hadjiconstantinou M., Rossetti Z.L. (1990), *The non-competitive NMDA-receptor antagonist MK-801 prevents the massive release of glutamate and aspartate from rat striatum induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)*. *Neurosci. Lett.*, 117, 129–133.
- [242] Shen X.M., Dryhurst G. (1996), *Oxidation chemistry of (–)-norepinephrine in the presence of L-cysteine*. *J. Med. Chem.*, 39, 2019–2029.
- [243] Li H., Dryhurst G. (1997), *Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1): a putative nigral endotoxin of relevance to Parkinson's disease*. *J. Neurochem.*, 69, 1530–1541.
- [244] Li H., Shen X.M., Dryhurst G. (1998), *Brain mitochondria catalyze the oxidation of 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1) to intermediates that irreversibly inhibit complex I and scavenge glutathione: potential relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease*. *J. Neurochem.*, 71, 2049–2062.